



XI МЕЖДУНАРОДНАЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА | 2023

СБОРНИК ТРУДОВ

Москва

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ЦЕНТР СТРАТЕГИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ И УПРАВЛЕНИЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИМИ РИСКАМИ ЗДОРОВЬЮ»
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

АССОЦИАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТОВ И ОРГАНИЗАЦИЙ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ
«ФЕДЕРАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ГРИППА ИМЕНИ А.А. СМОРОДИНЦЕВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ПЕТРА ВЕЛИКОГО»
МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

XI Международная научно-практическая конференция

«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА»

СБОРНИК ТРУДОВ

ПЛАТИНОВЫЙ ПАРТНЁР: ООО «ИНТЕРЛАБСЕРВИС»

МОСКВА
2023

УДК 616-07:577.21(082)
ББК 53.4я43
М 75

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

Шипулин Г.А. (ответственный секретарь)
Амплеева М.А.
Богословская Е. В.
Давыдова Е. Е.
Злобовская О. А.
Куклина Н. Г.
Лисица Т. С.
Мацвай А. Д.
Микулович Ю. Л.
Насырова Р. Ф.
Орехов В. А.
Пименов Н. Н.
Полтавец А.С.
Савочкина Ю. А.
Серая Л. Г.
Шаповалова В. В.
Шуряева А. К.

М 75 Молекулярная диагностика. Сборник трудов / колл. авт.
Москва: АО «САЙЕНС МЕДИА ПРОДЖЕКТС», 2023. – 576 с.
SBN 978-5-60489946_8_2

Аннотация:

В сборнике трудов конференции представлены результаты научных исследований российских и зарубежных специалистов в области молекулярной диагностики.

Приводятся работы по применению молекулярных методов в этиологической диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями. Рассматриваются проблемы диагностики таких заболеваний как вирусные гепатиты, туберкулез, коронавирусная инфекция SARS-CoV-2, а также инфекции с воздушно-капельным и контактно-бытовым механизмом передачи возбудителя и их осложнения. Отдельно поднимаются вопросы внутрибольничных инфекций и антибиотикорезистентности микроорганизмов, качества, безопасности, эффективности молекулярной диагностики. Представлены современные подходы к молекулярной диагностике особо опасных инфекций, а также материалы по новым направлениям молекулярной диагностики ВИЧ и ВИЧ-ассоциированных инфекциям, инфекций органов репродукции, молекулярным методам в диагностике внутриутробных инфекций.

Значительное место уделено исследованиям по онкологии, ВПЧ-тестированию и профилактике рака шейки матки. Рассматриваются работы по генетике мультифакторных заболеваний, диагностике и изучению моногенных заболеваний, фармакогенетике, а также применению технологий молекулярного анализа в криминалистике и судебной медицине.

В сборнике представлены работы по применению молекулярно-генетических методов в трансфузиологии и трансплантологии, по диагностике оппортунистических инфекций, а также новейшие разработки в области массового параллельного секвенирования (NGS).

Отдельные главы посвящены контролю качества и безопасности продуктов питания, а также молекулярным методам в воспроизводстве и защите растений в сельском и лесном хозяйстве. Описываются различные подходы и технологии выявления инфекционных и наследственных болезней животных, молекулярной диагностики и эпидемиологии природно-очаговых инфекций.

Сборник предназначен для специалистов в области лабораторной диагностики и научных работников, будет интересен инфекционистам, эпидемиологам, гинекологам, урологам, дерматовенерологам, гастроэнтерологам, гепатологам, пульмонологам, онкологам, фтизиатрам, трансфузиологам, трансплантологам, генетикам, судебно-медицинским экспертам, ветеринарным врачам, врачам общей практики, студентам и аспирантам биологических, медицинских и ветеринарных специальностей.

Издан в Российской Федерации по решению организационного комитета XI Международной научно-практической конференции «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА».

ISBN 978-5-60489946_8_2

УДК 616-07:577.21(082)
ББК 28.04

© Коллектив авторов, 2023



ПРЕДИСЛОВИЕ К СБОРНИКУ ТЕЗИСОВ XI МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2023»

Молекулярная диагностика — важнейшее направление развития современной лабораторной медицины, которое полностью изменило ее ландшафт и открыло новые горизонты в диагностике, терапии и профилактике. В диагностических лабораториях нашли применение новые технологии и методы молекулярного анализа, такие как секвенирование следующего поколения (NGS), а в последние годы и нанопоровое секвенирование, масс-спектрометрия, методики быстрой изотермической амплификации. Появляются все новые возможности для расшифровки сложнейших клинических состояний, диагностики в парадигме персональной медицины, своевременного выявления инфекционных и соматических заболеваний, противодействия эпидемиологическим угрозам.

Пандемия COVID-19 стала серьезным вызовом для медико-биологических наук в нашей стране и за рубежом, но в то же время многократно ускорила развитие современных технологий, в том числе и в сфере диагностики. Разработанные в кратчайшие сроки диагностические тесты на основе ПЦР, ИХА, изотермических методов амплификации позволяли своевременно выявлять новые случаи COVID-19, а опыт, накопленный во время пандемии, открыл пути к разработке аналогичных диагностических тестов для других инфекционных заболеваний. Методы секвенирования обеспечивают мониторинг патогенов и распространения новых генетических вариантов. Более того, становится реальностью применение секвенирования в клинической диагностике инфекционных, онкологических, наследственных заболеваний. Для противодействия COVID-19 была создана обширная приборная и кадровая база в медицинских учреждениях. Многократно увеличилось количество специалистов, владеющих современными технологиями, которые, несомненно, найдут применение и в постковидную эпоху; другими словами, выросло число потенциальных участников «Молекулярной диагностики».

Предыдущая, юбилейная конференция «Молекулярная диагностика» проводилась в Москве в 2021 году, когда еще действовали многие ковидные ограничения (что не помешало успешно провести ее в формате режиме). Два последующих года были непростыми, однако молекулярная диагностика продолжала свое развитие. На рынок выходили новые технологии и приборы, в секторе секвенирования появились новые игроки, в том числе китайские компании, уверенно конкурирующие с лидерами. Продукция MGI и других китайских разработчиков пришла на российский рынок, где хорошо себя зарекомендовала. Российские компании приступили к решению задач по импортозамещению, и для потребителей стал доступен новый ассортимент приборов и реагентов.

Как и в предыдущие годы, на MDx представлены все ключевые направления и достижения молекулярной диагностики текущего десятилетия. Трехдневная программа конференции включает 2 пленарных заседания, 35

секций, на которых выступят с докладами о новейших технологиях молекулярной диагностики, мониторинга и лечения инфекционных заболеваний более 200 лидеров в своих областях, ведущих ученых и специалистов, а также круглый стол по неинвазивному пренатальному тестированию (NIPT) и заседание Дискуссионного стола Ассоциации специалистов медицины плода Национального общества пренатальной медицины «Репродуктивный выбор пациента: задачи, возможности и врачебная ответственность». Кроме того, в рамках конференции состоятся 13 сателлитных симпозиумов, организованных крупнейшими дистрибьютерами и производителями, предлагающими передовые решения в области молекулярной диагностики. Параллельно на площадке пройдет уникальная по масштабу выставка современного медицинского диагностического оборудования.

Программа конференции и сборник трудов включают разделы, посвященные диагностике моногенных заболеваний, которая в этом году вышла в России на новый уровень благодаря национальной программе неонатального скрининга. Диагностическая поддержка репродуктивной медицины — одно из важнейших направлений молекулярной диагностике. Представлены и многие другие не теряющие актуальности области, в том числе диагностика туберкулеза, борьба с ВИЧ-инфекцией и гепатитами, молекулярная онкодиагностика и онкогенетика, проблемы антибиотикорезистентности микроорганизмов. На отдельной секции обсуждаются вопросы палеогеномики в России. Наконец, в этом году впервые организована секция, посвященная Дню геномной селекции в животноводстве KSIDAY 2023, а секция «Молекулярные методы в воспроизводстве и защите растений в сельском и лесном хозяйстве» пройдет во второй раз..

Данный сборник включает 462 тезисов, которые отражают современные тенденции развития молекулярной диагностики и эпидемиологии в области инфекционных заболеваний человека, в том числе острых респираторных заболеваний, ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов, туберкулеза, природно-очаговых и особо опасных инфекций, инфекций органов репродукции и инфекционной патологии.

гии желудочно-кишечного тракта. Важнейшей тематикой для рассмотрения в рамках конференции является проблема антибиотикорезистентности, представляющая в настоящее время огромное социально-экономическое значение и рассматриваемая как угроза национальной безопасности России.

Сборник содержит труды, посвященные развитию генетических технологий, используемых в онкодиагностике и онкогенетике, в диагностике мультифакторных и моногенных заболеваний. Отдельные разделы посвящены практическому применению массового па-

раллельного секвенирования (NGS) и применению молекулярных методов в трансфузиологии и трансплантологии. Кроме того, в сборнике представлены работы по использованию молекулярных методов диагностики в ветеринарии, контролю качества и безопасности продуктов питания.

Оргкомитет конференции уверен, что «Молекулярная диагностика» позволит обобщить опыт широкого круга специалистов из разных областей здравоохранения, и станет событием года в истории отечественной лабораторной диагностики.

Ответственный секретарь
XI Международной научно-
практической конференции
«Молекулярная диагностика»



Шипулин Герман Александрович

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

ПРЕДСЕДАТЕЛИ И ЧЛЕНЫ ОРГАНИЗАЦИОННОГО КОМИТЕТА

СКВОРЦОВА Вероника Игоревна	Руководитель Федерального медико-биологического агентства (председатель)
ПЛУТНИЦКИЙ Андрей Николаевич	Заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации (председатель)
ЮДИН Сергей Михайлович	Генеральный директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (заместитель председателя)
ШИПУЛИН Герман Александрович	Директор постгеномных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ответственный секретарь)
РУДСКОЙ Андрей Иванович	Ректор Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (заместитель председателя)
ЛИОЗНОВ Дмитрий Анатольевич	Директор федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный внештатный специалист по инфекционным болезням Министерства здравоохранения Российской Федерации по Северо-Западному федеральному округу (заместитель председателя)

ЧЛЕНЫ ОРГАНИЗАЦИОННОГО КОМИТЕТА

БОБКОВА Марина Ридовна	Главный специалист Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», консультант Научно-исследовательского института вирусологии Министерства здравоохранения Республики Узбекистан
ВАСИЛЬЕВА Наталья Всеволодовна	Директор Научно-исследовательского института медицинской микологии им. П.Н. Кашкина Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России
ВАСИН Андрей Владимирович	Директор Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого
ГАСИЧ Елена Леонидовна	Заведующая лабораторией диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» (Республика Беларусь)
ГЛОТОВ Андрей Сергеевич	Заведующий отделом геномной медицины им. В.С. Баранова Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
ГЛОТОВ Олег Сергеевич	Заведующий НИО экспериментальной медицинской вирусологии, молекулярной генетики и биобанкинга Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»
ГОЛЬДБЕРГ Аркадий Станиславович	Проректор по экономике и развитию Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, директор Ассоциации «Федерация лабораторной медицины»
ГОРБУНОВ Владимир Анатольевич	Директор государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» (Республика Беларусь)
ГОРСКИЙ Евгений Вячеславович	Генеральный директор ООО «Троицкий инженерный центр»
ГУЩИН Владимир Алексеевич	Руководитель лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ДАНИЛЕНКО Дарья Михайловна	Заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ДЕДКОВ Владимир Георгиевич	Заместитель директора по научной работе Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ДЕМИДОВА Ирина Анатольевна	Заведующая молекулярно-биологической лабораторией государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московская городская онкологическая больница №62 Департамента здравоохранения города Москвы»
ЖИБУРТ Евгений Борисович	Заведующий кафедрой трансфузиологии и проблем переливания крови Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, академик РАЕН
ЗАБЕРЕЖНЫЙ Алексей Дмитриевич	Директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»
ИВАНОВ Андрей Михайлович	Президент Ассоциации «Федерации лабораторной медицины», заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, главный внештатный специалист по клинической лабораторной диагностике Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга
ИЛЛАРИОШКИН Сергей Николаевич	Заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», директор Института мозга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», Заведующий кафедрой неврологии Московского Государственного Медико-Стоматологического Университета имени А.И. Евдокимова, академик РАН
ИМЯНИТОВ Евгений Наумович	Заведующий научным отделом биологии опухолевого роста Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
КАФТЫРЕВА Лидия Алексеевна	Заведующая лабораторией кишечных инфекций, руководитель отдела микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора
КОЛБАСОВ Денис Владимирович	Директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»
КУБАНОВ Алексей Алексеевич	Директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации
КУДРЯВЦЕВА Анна Викторовна	Заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
КУЛИКОВА Инна Борисовна	Директор Департамента организации экстренной медицинской помощи и управлению рисками здоровью Министерства здравоохранения Российской Федерации (заместитель председателя)
КУЦЕВ Сергей Иванович	Директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», главный внештатный специалист по медицинской генетике Министерства здравоохранения Российской Федерации, академик РАН
ЛАРИОНОВА Валентина Ильинична	Президент Ассоциации специалистов в области молекулярной медицины, лабораторной и медицинской генетики имени Е.И. Шварца, профессор кафедры медицинской генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ЛИТВИНОВА Мария Михайловна	Заместитель заведующего кафедрой по научной работе, доцент кафедры медицинской генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

ЛУКАШЕВ Александр Николаевич	Директор Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Клинического центра Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)
ЛЮБЧЕНКО Людмила Николаевна	Заведующая отделом молекулярной генетики и клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации
МИХАЙЛЕНКО Дмитрий Сергеевич	Заведующий кафедрой онкогенетики ИВиДПО Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
МОКРОУСОВ Игорь Владиславович	Заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Федерального государственного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
МУСАБАЕВ Эркин Исакович	Директор Научно-исследовательского института вирусологии Министерства здравоохранения Республики Узбекистан
НАСЫРОВА Регина Фаритовна	Руководитель института персонализированной психиатрии и неврологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национального медицинского исследовательского центра психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ПОДКОЛЗИН Александр Тихонович	Заместитель директора по эпидемиологии Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ПОКРОВСКИЙ Вадим Валентинович	Заведующий специализированным научно-исследовательским отделом по профилактике и борьбе со СПИДом Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ПОТЕКАЕВ Николай Николаевич	Директор Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский научно-практический Центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения города Москвы», заведующий кафедрой кожных болезней и косметологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный внештатный специалист по дерматовенерологии и косметологии Министерства здравоохранения Российской Федерации
ПРОХВАТИЛОВА Лариса Борисовна	Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных» («ВНИИЗЖ»), кандидат биологических наук, доцент
ПРОХОРЧУК Егор Борисович	Заведующий лабораторией геномики и эпигеномики позвоночных Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», декан медико-биологического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ПУЗЫРЕВ Валерий Павлович	Научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»
СЕРАЯ Лидия Георгиевна	Заведующая отделом патологии декоративных и садовых культур Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» руководитель «Центра защиты растений Гартенбург»
СИДОРЕНКО Сергей Владимирович	Руководитель отдела молекулярной микробиологии и медицинской эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»
СТЕПАНОВ Вадим Анатольевич	Директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»
СУВОРОВ Александр Николаевич	Заведующий отделом молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

СЫЧЕВ Дмитрий Алексеевич	Ректор Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, академик РАН
ТАРАСЕНКО Ольга Анатольевна	Главный ученый секретарь Ассоциации «Федерация лабораторной медицины», член Президиума Ассоциации «Федерация лабораторной медицины», д.м.н., профессор, заместитель генерального директора Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники»
ЧЕХОНИН Владимир Павлович	Заместитель президента Федерального государственного бюджетного учреждения «Российская Академия Наук», академик РАН
ЧУЛАНОВ Владимир Петрович	Заместитель директора по научной работе и инновационному развитию Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный внештатный специалист по инфекционным болезням Министерства здравоохранения Российской Федерации

Раздел 1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА, СОДЕРЖАЩЕГО СРЕДИННЫЙ ФРАГМЕНТ КАПСИДНОГО БЕЛКА ВИРУСА ГЕПАТИТА E 1 ГЕНОТИПА

Козлов В.А., Сидоров А.В., Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Зверев В.В.

ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Введение. Гепатит E (ГЕ) — опасное вирусное заболевание, распространенное не только в странах с жарким климатом, но и в странах Америки и Евразии с умеренным климатом, в том числе в России. В странах центральной Азии и Африки доминирует вирус гепатита E (ВГЕ) 1 генотипа. В связи с масштабной трудовой миграцией из бывших союзных республик центрально-азиатского региона существует большой риск завоза ВГЕ 1 генотипа на территорию России. Диагностические возможности тест-систем для генотипирования ВГЕ на основе метода ПЦР ограничены в связи с коротким периодом вiremии. Разработка серологических методов, способных определять генотип ВГЕ на поздних стадиях ГЕ, является актуальной и своевременной. В современных тест-системах для серодиагностики ГЕ применяются рекомбинантные антигены, содержащие С-концевые фрагменты белка ORF2 ВГЕ. По данным последних исследований, срединный домен ORF2 может также иметь диагностическую ценность, особенно при определении антител к разным генотипам вируса.

Цель. Получение рекомбинантного антигена, содержащего срединный фрагмент капсидного белка ВГЕ, для последующего использования в диагностических тестах.

Материалы и методы. штамм *E. coli* XL-Blue [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)], штамм *E. coli* POP2136 [F— glnV44 hsdR17 endA1 thi-1 aroB mal — cl85], плазмидные векторы pKAN-T и pEX1, олигонуклеотидные праймеры. Биоинформационные методы (анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайн праймеров), молекулярно-биологические методы (выделение плазмидной ДНК, электрофорез ДНК в агарозном геле, определение

первичной структуры ДНК, ПЦР-амплификация, клонирование ДНК), микробиологические методы, биохимические методы (выделение и хроматографическая очистка белков, электрофорез по Лэммли).

Основные результаты. Получена система для экспрессии рекомбинантного аналога срединной части белка ORF2 ВГЕ 1 генотипа, которая включает S-домен, формирующий вирусную оболочку, а также M-домен, отвечающий за формирование икосаэдрической формы вириона. Для этого на матрице ранее полученной ДНК-копии бицистронной РНК ВГЕ 1 генотипа при помощи ПЦР-амплификации был синтезирован фрагмент ДНК, соответствующий срединной части гена *orf2* с 363 по 1280 нуклеотидных остатков. Затем было проведено АТ-клонирование ПЦР-продукта в вектор pKAN-T с последующим клонированием в экспрессирующий вектор pEX1 по сайту рестрикции BamH1. Наличие и правильность ориентации вставки подтверждали секвенированием. Из биомассы клеток штамма *E. coli* POP2136, трансформированных полученной плазмидой, был выделен и хроматографически очищен рекомбинантный полипептид в виде химерного белка, содержащего слитный с β-галактозидазой *E. coli* срединный фрагмент капсидного белка ВГЕ 1 генотипа. По результатам электрофореза данный белок имеет молекулярную массу, соответствующую расчетной величине 145 кДа.

Выводы. В системе экспрессии *E. coli* получен рекомбинантный белок, содержащий слитный β-галактозидазой *E. coli* срединный фрагмент капсидного белка ВГЕ 1 генотипа. Изучение его антигенных свойств и диагностической значимости является предметом дальнейших исследований.

ВЫЯВЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Вилисова А.Н.

АО «ЭКОлаб», Электрогорск, Россия

Введение. Вирус гепатита В (HBV) является представителем семейства *Hepadnaviridae*. Контагиозность вируса гепатита В в 50-100 раз выше, чем у ВИЧ: инфицирующая доза составляет 0,0000001 мл сыворотки, содержащей ВГВ. Вирус гепатита В может выживать до 7 дней вне тела

человека при комнатной температуре на предметах, поверхностях окружающей среды. В настоящее время 3,5 % населения мира хронически инфицированы этим вирусом и подвержены риску развития опасных для жизни заболеваний печени. Обладая высокой контагиозностью, важ-

но своевременно проводить диагностику, позволяющую выявлять вирус в латентной форме и на ранних стадиях, что позволит своевременно назначить лекарственную терапию и снизит уровень распространенности вируса. Всё это позволяет сделать молекулярно-генетическая диагностика. Полимеразная цепная реакция (ПЦР), как один из её методов является в настоящее время золотым стандартом. В связи с этим набор реагентов для выявления и количественного анализа может быть использован в клинической практике для диагностики гепатита В и оценки эффективности противовирусной терапии.

Цель и задачи. Разработать набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Гепатита В (HBV) методом ПЦР.

Материалы и методы. Для решения задачи, связанной с выявлением и количественным определением ДНК HBV, образцы были предоставлены Медицинской компанией ИНВИТРО г. Москва. Экстракцию ДНК проводили методом осаждения изопропанолом. Полученный осадок ДНК был элюирован 60 мкл ТЕ-буфера. Полученная очищенная ДНК, выделенная из каждого образца, как описано выше, была поставлена в ПЦР. Амплификация проводилась в амплификаторе «CFX96» («Bio-Rad Laboratories Inc.»). Перед началом исследования все последовательности праймеров и продукты ПЦР были проанализированы с использованием базы данных Genbank. Специфичность выбранных олигонуклеотидов изучали с помощью компьютерной программы BLAST online. Для количественного определения ДНК ВГВ в

пробе были созданы стандарты, содержащее заведомо известное количество копий ДНК/мл.

Результаты. В результате проведенного исследования по разработке набора была проведена серия оптимизационных экспериментов, в результате которых была подобрана реакционная смесь и программа амплификации. Контроль работы набора был проверен путем тестирования на заведомо охарактеризованном клиническом материале в количестве 100 образцов. Для оценки воспроизводимости результатов разработанный набор в разные дни был протестирован на всех 100 образцах охарактеризованного клинического материала. Оценка перекрёстной реактивности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной РНК/ДНК следующих микроорганизмов и вирусов: вирус гепатита А, вирус гепатита D, вирус гепатита С, вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса типы 1, 2, вирус ветряной оспы, вирус герпеса человека типы 6, 8, *Ното sariens*. Перекрестные реакции для указанных микроорганизмов и вирусов зарегистрированы не были.

Набор реагентов показал чувствительность 97-100% и специфичность 100% на имеющейся базе, состоящей из 100 охарактеризованных клинических образцов, предоставленных медицинской компанией ИНВИТРО.

Выводы. В результате проведенной работы был разработан и оптимизирован набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Гепатита В (HBV) в клиническом материале методом ПЦР.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СРЕДИ УСЛОВНО ЗДОРОВОГО МОЛОДОГО НАСЕЛЕНИЯ СЕВЕРО-ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ ВЬЕТНАМА

Личная Е.В.¹, Bui Thi Thanh Nga², Pham Thi Ha Giang², Петрова О.А.¹, Старкова Д.А.¹, Bui Thi Lan Anh², Tran Thi Nhai³, Vo Viet Cuong², Pham Ngoc Quang², Дмитриев В.А.³, Калинина О.В.^{1,4}

¹ ФГБУ «СПбНИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

² Совместный Российско-Вьетнамский Тропический научный и технологический центр, Ханой, Вьетнам

³ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

Наносимый вирусом гепатита В ущерб здоровью населения приводит к значительным экономическим потерям во всем мире, наибольшее бремя лежит на эндемичных странах Западной части Тихого океана и Африканского региона. Одним из факторов, влияющих на хронизацию инфекции и длительность циркуляции ВГВ в популяции, является генетическое разнообразие, которое приводит к формированию пула «ускользающих» мутантных вариантов вируса. В зависимости от локализации мутации в геноме, ВГВ способны ускользать от вакцин-индуцированного иммунного ответа (мутации в S-гене), от действия противовирусных препаратов (мутации в P-гене), приводить к ложноотрицательным результатам при скрининге.

Цель работы: изучить генетическое разнообразие изолятов HBV, циркулирующих среди условно здорового молодого населения Вьетнама.

Материалы и методы. В исследование включены 22 изолята HBV, выделенные в 2018 г в регионах Than Nhuyen и Da Nang от условно здоровых лиц в возрасте 19-22 года. Полноразмерный геном ВГВ амплифицирован пятью перекрывающимися фрагментами. Секвенирование выполнено методом Сенгера с использованием BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Kits (PE Biosystems, version 3.1) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, USA). Полученные нуклеотидные последовательности собирали, анализировали с помощью пакета программ LASERGENE (США). Филогенетический анализ выполняли методом Maximum-Likelihood в программе Mega, анализ явления рекомбинации в программе SimPlot версия 3.5.1

Результаты. На основе филогенетического анализа preS/S области генома 18 из 22 изолята относились к субгенотипу В4, остальные 4 — к субгенотипу С1. При этом 16

изолятов, принадлежавших к субгенотипу В4 по данным филогенетического анализа, основанного на preS/S области генома, имели рекомбинационное событие в preC/C области генома с вариантами HBV генотипа С. На основании анализа «а» детерминанты S гена 22 изолятов HBV были идентифицированы три субтипа: ауw1, adr, adrq-. Все изоляты субгенотипа В4 относились к субтипу ауw1, тогда как 4 изолята субгенотипа С1 принадлежали к субтипу adr, а один к субтипу adrq-. В области «а» детерминанты в preS/S области генома только у одного изолята, выделенного в городе Thai Nguen, была идентифицирована редкая замена G145K, которая относится к мутациям, ассоциированным с ускользанием от действия вакцины (vaccine escape mutation). Дополнительных мутаций в положениях E164 и I195 у этого изолята обнаружено не было, однако имелась мутация в

основном промоторе core области T1753C. Ни у одного из 22 изученных изолятов не было обнаружено аминокислотных замен, ассоциированных с устойчивостью к аналогам нуклеозидов, тем не менее один изолят имел две мутации в основном промоторе core области A1762T и G1762A, один изолят — только одну мутацию A1762T.

Выводы. Структура популяции HBV, циркулирующей среди молодого населения, характеризовалась значительной гетерогенностью, что указывает на успешность распространения HBV инфекции среди населения. Доминирование рекомбинантной формы В4/С среди всех изученных вариантов HBV, выделенных от условно здорового населения в возрасте 18-29 лет в 2018 г, а также его превалирование в других регионах по данным литературы указывает на его эпидемическую значимость для Вьетнама.

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (ВГВ) И СУБТИПИРОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВГВ (HBsAg) С ПОМОЩЬЮ ПАНЕЛИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

Потапова А.А.¹, Маркина Е.В.¹, Порываева В.А.², Безуглова Л.В.², Нетесова И.Г.²

¹ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России), Москва, Россия

² АО «Вектор-Бест», Новосибирская область, р.п. Кольцово, Россия

Актуальность. В настоящее время выделено 10 генотипов вируса гепатита В, которые различаются тяжестью течения, прогнозом эффективности лечения и исхода заболевания. Для генотипирования вируса гепатита В (ВГВ) в настоящее время используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с генотип-специфичными праймерами или амплификацию фрагмента вирусного генома с последующим секвенированием, для которых необходимы сложное оборудование и реактивы. В России разработана оригинальная методика определения генотипов ВГВ и субтипов поверхностного антигена ВГВ (HBsAg) в HBsAg-положительных пробах сыворотки и плазмы крови человека с Панелью моноклональных антител (МАТ) методом иммуноферментного анализа (ИФА) [1], которая может быть использована в рутинной лабораторной практике.

Цель данной работы — оценить возможность иммуноферментного генотипирования ВГВ и субтипирования HBsAg в HBsAg-положительных пробах сыворотки крови, выявляемых с различной оптической плотностью (ОП) в ИФА в клинической лаборатории.

Материалы и методы. В работе исследовали 40 проб сыворотки крови человека с положительными результатами верификации наличия HBsAg в наборе реагентов «Вектоген В-HBs-антиген-подтверждающий тест» (АО «Вектор-Бест», Россия). При оценке результатов данного теста учитывают величину ОП образца в прямом ИФА и % подавления сигнала в конкурентном ИФА; ОП выражают в оптических единицах (о.е.).

Генотипы ВГВ и субтипы HBsAg устанавливали с помощью четырех конъюгатов узкоспецифических МАТ с пероксидазой хрена по методике, описанной ранее [1].

Результаты и обсуждение. По результатам подтверждающего теста выделены 3 группы проб: 1) величина ОП менее 2,0 о.е., подавление сигнала в конкурентном ИФА более 50% (19 проб); 2) величина ОП более 2,0 о.е., подавление сигнала в конкурентном ИФА более 50% (15 проб); 3) величина ОП более 2,0 о.е., подавление ОП в конкурентном ИФА менее 50% при стандартном режиме регистрации данных; наличие HBsAg в них верифицировано по результатам вспомогательного измерения, описанного в инструкции к набору (6 проб), которое проводится без внесения стоп-реагента,

В 19 пробах пациентов со значениями ОП менее 2 о.е. в прямом ИФА и подавлением сигнала более 50% в конкурентном ИФА (группа 1) генотипы ВГВ и субтипы HBsAg не определялись.

В четырех из 15 проб (27%) группы 2, исследованных согласно разработанной оригинальной методике, количество HBsAg было достаточным для определения генотипа ВГВ и субтипа HBsAg. Во всех пробах установлен генотип D ВГВ и субтип HBsAg ауw2.

В 100% образцов (6/6) группы 3 с верификацией HBsAg, проведенной при вспомогательном измерении без стоп-реагента, результаты генотипирования ВГВ/ субтипирования HBsAg были успешными, все генотипа D ВГВ: ауw2 (n=3), ауw3 (n=3).

ТАБЛИЦА. РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВГВ/ СУБТИПИРОВАНИЯ HBsAg В НАТИВНЫХ ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТКИ КРОВИ

№	«Вектоген В-НВs-антиген-подтверждающий тест»			Методика генотипирования ВГВ/ субтипирования HBsAg [1], результаты представлены в ОП					
	ОП _{прям}	ОП _{конк}	% подавления	Конъюгаты МАТ-ПХ				Субтип HBsAg	Генотип ВГВ
				SM	E1	H2	D4		
				ОП _{крит.} = 0,105	ОП _{крит.} = 0,105	ОП _{крит.} = 0,101	ОП _{крит.} = 0,108		
1	3,890	0,466	90,2	0,282	0,33	0,492	0,022	ayw2	D
2	3,830	0,079	99,7	0,137	0,177	0,302	0,079	ayw2	D
3	3,630	0,410	90,4	0,260	0,433	0,979	0,139	ayw2	D
4	3,550	1,280	65,8	0,254	0,314	0,342	0,018	ayw2	D
5	1,230	0,495	2,48*	0,895	1,220	0,018	0,012	ayw3	D
6	1,500	0,243	6,17*	0,211	0,216	0,010	0,011	ayw3	D
7	0,915	0,201	4,55*	1,500	1,700	3,380	0,769	ayw2	D
8	0,859	0,361	2,38*	1,450	1,590	3,240	0,515	ayw2	D
9	1,220	0,117	10,4*	0,447	0,551	0,983	0,021	ayw2	D

*Позитивность образца (ПО) во вспомогательном измерении без внесения стоп-реагента согласно инструкции изготовителя; ПО= (ОПпрям (П))/(ОПконк (К))

Кроме того, в пробе №10, разведенной в 10 раз, с HBsAg, подтвержденным при вспомогательном измерении, результаты реакций с конъюгатами МАТ соответствовали генотипу D ВГВ, субтипу HBsAg ayw3.

В целом, с помощью разработанной оригинальной методики с применением МАТ изучены характеристики ВГВ 10 образцов с наличием HBsAg: ayw2 (n=7), ayw3 (n=3), все отнесены к генотипу D ВГВ. Представленные выше результаты, полученные с помощью Панели МАТ в ИФА, хорошо согласуются с данными молекулярной эпидемиологии о значительном преобладании на территории РФ генотипа D.

Выводы. Установлены генотип D ВГВ и субтипы HBsAg ayw2, ayw3 (7:3) с помощью разработанной оригинальной методики с применением МАТ в HBsAg-положительных пробах пациентов, выявленных в ИФА с различной ОП и верификацией наличия HBsAg при стандартном либо вспомогательном (без внесения стоп-реагента) режимах регистрации данных. При оценке возможности иммуно-

ферментного генотипирования ВГВ и субтипирования HBsAg установлено, что применение разработанной методики эффективно для 27 % образцов со значением ОП более 2,0 о.е. в прямом ИФА и верификацией наличия антигена при стандартной процедуре проведения ИФА. При вспомогательном режиме регистрации данных о наличии HBsAg (без внесения стоп-реагента) генотипирование ВГВ и субтипирование HBsAg успешно в 100% образцов.

Литература.

1. Безуглова Л.В., Мануйлов В.А., Осипова Л.П., Мосина Я.Д., Порываева В.А., Агафонова О.А., Могильных А.К., Нетесов С.В., Нетесова И.Г. Результаты испытаний реагентов для иммуноферментного определения субтипа HBsAg и генотипа вируса гепатита В в образцах плазмы крови человека. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2020; 38(4):188–195. <https://doi.org/10.17116/molgen2020380411884>

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ РНК ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА E СРЕДИ ДОНОРОВ КРОВИ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

Савчук Т.Н., Гринвальд Е.Н., Абдрахманова С.А., Имашпаев Д.М., Жангазиева К.Х., Саусакова С.Б.

РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» МЗРК, г. Астана, Республика Казахстан

Введение. В то время, как большинство случаев инфицирования людей вирусом гепатита E (ВГЕ) во всем мире происходит из зараженной воды или пищевых источников

[EASL clinical practice guidelines on hepatitis E virus infection. J Hepatol. 2018], наблюдается неуклонный рост числа зарегистрированных случаев передачи ВГЕ при переливании

донорской крови [ВОЗ, 2016]. Ежегодно во всем мире регистрируется около 20 миллионов случаев инфекции ВГЕ. Среди этих случаев примерно 3,3 миллиона человек испытывают симптоматическое заболевание, а 56 600 случаев заканчиваются летальным исходом.

Потребность в скрининге на ВГЕ приобретает все большее значение, как важная проблема общественного здравоохранения для развивающихся и развитых стран, из-за растущей тенденции серологической распространенности ВГЕ среди населения мира и того факта, что данная инфекция может вызывать серьезные клинические последствия у тех пациентов, которые больше всего нуждаются в донорстве крови [Denner J, 2019].

Целью исследования является оценка риска парентеральной передачи вирусного гепатита Е с донорской кровью в Республике Казахстан на основании результатов тестирования генетического материала настоящего вируса в плазме доноров крови.

Методы. В исследование были включены здоровые лица, доноры крови. Для целей исследования был разработан специальный опросник, предназначенный для получения информации о социо-демографических и поведенческих характеристиках доноров крови.

Определение РНК ВГЕ проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на автоматическом анализаторе Cobas 6800 путем объединения 6 образцов.

Исследование проводилось с соблюдением всех требований комитета по этике. Участники проекта были проинформированы о том, что их образец крови будет проверен на дополнительный маркер и для статистической обработки результатов будут использованы обезличенные данные.

Результаты. Были исследованы образцы 16 147 доноров крови РНК ВГЕ. Участники составляют 6,8% от общей донации крови в республике. Сбор образцов производил-

ся у субъектов из всех регионов Республики Казахстан.

В нашем исследовании по результатам тестирования у доноров из центров крови юга, севера, запада и востока Казахстана РНК вирусного гепатита Е не была обнаружена.

Выводы. В рамках данного проекта впервые был проведен скрининг на вирус гепатита Е (ВГЕ) среди здоровых лиц — доноров крови в Казахстане. Полученные результаты указывают на отсутствие актуальной проблемы ВГЕ среди доноров в республике в данное время. Это свидетельствует об эффективности мер безопасности и скрининга, применяемых в учреждениях по сбору крови, что обеспечивает надежную защиту от передачи ВГЕ через донации.

Тем не менее, стоит отметить, что включение новых маркеров ВГЕ в стандарт скрининга донорской крови имеет свои преимущества. Это повышает безопасность донорских компонентов крови и позволяет выявлять доноров с инфекцией ВГЕ на ранних стадиях, что особенно важно для защиты уязвимых получателей трансфузий. Однако, следует учитывать, что такое внедрение может привести к увеличению количества списания непригодных для переливания компонентов крови, что повлечет за собой финансовые потери для центров крови.

Финансирование. Данное исследование было поддержано путем предоставления реагентов компанией «Roche» из Чикаго, США.

Список литературы

1. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines on hepatitis E virus infection // J Hepatol. — 2018. — Vol. 68, Issue 6. — P. 1256-1271.
2. Smith DB, Simmonds P, Izopet J et al. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes // J Gen Virol. — 2016. — Vol.97, Issue 3. — P. 537-542.
3. Denner J. Hepatitis E virus (HEV) The Future // Viruses. — 2019. — Vol. 11, Issue 3. — P. 251.

КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ HBV DNA (ПЦР-РВ) И КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ HBSAG (ИФА) В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Николаева А.Н.^{1,2}, Кан Н.Г.³, Жолдасова Е.А.³, Хегай Т.Р.^{1,2}

¹ООО ROSSA, г.Нурафшан, Узбекистан

²Институт Иммунологии и Геномики человека АНРУз, г.Ташкент, Узбекистан

³НИИ Вирусологии РСНПМЦЭМИПЗ, Ташкент, Узбекистан

Гепатит В — это вирусное инфекционное заболевание, поражающее печень и протекающее в острой или хронической форме. По данным ВОЗ от вирусного гепатита В ежегодно умирают 900 000 человек.

Цель: Изучить корреляционную связь между вирусной нагрузкой HBV DNA (ПЦР) и количественными показателями HBsAg, с учетом HBeAg и anti-HBeAg (ИФА) в плазме крови от пациентов ХВГВ.

Материалы и методы: Было исследовано 27 образцов для выявления HBV DNA (ПЦР) с определением вирусной нагрузки и определения маркеров вирусного гепатита В HBsAg (количественный), HBeAg и anti-HBeAg

(ИФА). Материалом для исследования послужила плазма крови. Исследования проводились на базе НИИ Вирусологии РСНПМЦЭМИПЗ. Для определения вирусной нагрузки HBV методом ПЦР использовали набор фирмы Вектор Бест (Россия). Для количественного определения HBsAg методом ИФА была использована тест-система фирмы ROSSAmed (Узбекистан). Для определения HBeAg и anti-HBeAg использовались тест-системы фирмы Вектор Бест (Россия). Статистический анализ данных проводился с использованием Excel 2010 и Jamovi.

Результаты: Всего было обследовано 26 HBsAg-положительных образцов и 1 HBsAg-негативный образец. Все 27

образцов были протестированы на содержание HBV DNA, HBeAg, anti-HBeAg и количественного определения HBsAg. В HBsAg-негативном образце при дальнейшем анализе не было обнаружено HBV DNA, HBeAg и anti-HBeAg. Во всех 26 HBsAg-позитивных образцах были обнаружены антитела к HBeAg и 3 образца были HBeAg-позитивные. Количественное определение HBsAg в 26 образцах показало результаты от 60 до 6470 МЕ/мл.

Из 26 образцов 2 образца были отрицательными по результатам ПЦР на HBV DNA. При этом количество HBsAg в этих образцах было высоким — 4330 и 5780 МЕ/мл (норма <0,05 МЕ/мл). Один из ПЦР-отрицательных образцов был HBeAg-позитивным.

В 24 ПЦР-положительных образцах вирусная нагрузка колебалась в пределах от 37 до $3,4 \cdot 10^7$ МЕ/мл. В 3 образцах с низкой вирусной нагрузкой — 37, 37 и 72 МЕ/мл, количественное содержание HBsAg было 4910, 4280 и 5700 МЕ/мл соответственно. Образец с самой высокой вирусной на-

грузкой — $3,4 \cdot 10^7$ МЕ/мл показал самое высокое содержание HBsAg — 6470 МЕ/мл, при этом он был HBeAg-негативным. Тогда как 2 HBeAg-позитивных имели более низкую вирусную нагрузку — $2,6 \cdot 10^5$ и $3,4 \cdot 10^4$ МЕ/мл.

Для изучения корреляционной связи между количеством HBsAg в плазме крови и уровнем ДНК вируса гепатита В был проведен ранговый тест Спирмена. Коэффициент корреляции r составил 0.301 ($p=0.127$), что свидетельствует о весьма слабой связи между концентрацией HBsAg и количеством ДНК вируса гепатита В в плазме крови.

Выводы: Полученные нами данные указывают на слабую связь между концентрацией HBsAg и количеством ДНК вируса гепатита В в плазме крови у преимущественно HBeAg негативных пациентов. Необходимы дальнейшие исследования с большим количеством образцов для подтверждения полученных результатов и определения корреляционной связи в других группах пациентов с вирусным гепатитом В.

РАЗЛИЧИЯ В ТЕЧЕНИИ У МАКАК ЯВАНСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ 1, 3 И 4 ГЕНОТИПАМИ ВИРУСА ГЕПАТИТА E

Догадов Д.И.¹, Кюрегян К.К.^{2,3}, Миносян А.А.¹, Кочконян А.А.¹, Гончаренко А.М.¹, Карлсен А.А.^{2,3}, Шамсутдинова О.А.¹, Черкашина Е.В.¹, Карал-оглы Д.Д.¹, Михайлов М.И.^{2,3}

¹ ФГБНУ Курчатowskiй комплекс Медицинской приматологии НИЦ «Курчатowskiй институт», 354376, Сочи, Россия

² ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 111123, Москва, Россия

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия

Гепатит E в настоящее время представляют собой актуальную и важную проблему инфекционной патологии, нанося огромный ущерб здоровью населения и экономики многих стран мира.

Обезьяны являются важными лабораторными животными для изучения вируса гепатита E (ВГЕ), моделирование инфекции на этих животных позволяет ответить на ряд нерешенных вопросов: где локализуется вирус при хронической инфекции, какие механизмы способствуют его персистенции и хронизации патологического процесса, какую роль при этом играют факторы клеточного иммунитета. Использование низших обезьян Старого Света для моделирования ВГЕ-инфекции открывает также широкие перспективы для испытания новых вакцин и противовирусных препаратов.

Целью исследования являлось экспериментальное воспроизведение ВГЕ-инфекции на макаках яванских (*Macaca fascicularis*) изолятами вируса генотипов 1 (ВГЕ-1), 3 (ВГЕ-3) и 4 (ВГЕ-4), выделенных от человека, свиней и обезьян, соответственно. В задачи исследования также входило определение основных вирусологических, иммунологических и биохимических характеристик ВГЕ-инфекции у этих животных.

Материалы и методы. Для заражения животных использовали 10% фекальные экстракты, содержащие ВГЕ-1, ВГЕ-3 и ВГЕ-4, соответственно. Всего в экспериментах использовали 10 макак яванских в возрасте 2 лет. В первом эксперименте использовали 5 животных, двум из кото-

рых вводили по 2 мл суспензии ВГЕ-4 парентерально, еще 2 животным вводили по 6 мл суспензии ВГЕ-4 перорально, и одно животное использовалось в качестве отрицательного контроля. Во втором эксперименте также использовали 5 животных: двум парентерально вводили по 2 мл суспензии ВГЕ-1, еще двум парентерально вводили по 2 мл суспензии ВГЕ-3 генотипа, и также одно животное использовали для отрицательного контроля.

У всех животных производили сбор фекалий до и ежедневно после заражения на протяжении эксперимента для определения РНК ВГЕ. Также у животных еженедельно брали кровь для общего и биохимического анализа крови, определения РНК ВГЕ и анти-ВГЕ классов IgM и IgG. Среди биохимических показателей определяли маркеры функционального состояния печени — АЛТ, АСТ, ЛДГ, билирубин и щелочную фосфатазу.

Анти-ВГЕ определяли с помощью коммерческих тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M» производства НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород).

Выявление РНК ВГЕ проводили методом обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с вырожденными праймерами к участку открытой рамки считывания 2 (ОРС 2) ВГЕ. Для подтверждения специфичности детекции РНК ВГЕ выявленных вариантов вируса проводили прямое секвенирование амплифицированных фрагментов генома ВГЕ.

Результаты. У всех животных, зараженных парентерально, РНК ВГЕ выявлялась как в крови (начиная с недели 1 после заражения для ВГЕ-4, недель 1-3 для ВГЕ-3 и недель 3-4 для ВГЕ-1), так и в фекалиях (начиная с недели 1 после заражения). Однако период виремии был значительно короче (1 — 6 недель для ВГЕ-3, 7 недель для ВГЕ-4 и 8 — 9 недель для ВГЕ-1) по сравнению с продолжительностью выделения вируса с фекалиями: 16 — 17 недель для ВГЕ-1, 4 — 6 недель для ВГЕ-3 и 12 недель для ВГЕ-4. У животных, зараженных ВГЕ-4 перорально, виремия в крови не была выявлена, а выделение вируса с фекалиями продолжалось в течение 4 недель, начиная с недели 1 после заражения.

У животных, зараженных ВГЕ-1 и ВГЕ-4, анти-ВГЕ IgM обнаруживались с недели 4 после заражения и выявлялись на протяжении 3 и 4-8 недель соответственно, тогда как у животных, зараженных ВГЕ-3, анти-ВГЕ IgM были обнаружены уже на неделе 3 после заражения и выявлялись на протяжении 9-10 недель. Следует отметить, что у одного животного, зараженного ВГЕ-4 перорально, анти-ВГЕ IgM выявлены не были, у этого же животного анти-ВГЕ-IgG обнаруживались, начиная с недели 10 после заражения, тогда как у всех остальных животных анти-ВГЕ IgG начинали выявляться с недели 4 после инфицирования, независимо от генотипа вируса и способа заражения.

Среди биохимических показателей наблюдались выраженные изменения АЛТ и АСТ. Наиболее значительный подъем АЛТ наблюдался у животных, зараженных парентерально ВГЕ-4 — 121 — 140 ед/л (при норме АЛТ до 40 ед/л), тогда как у обезьян, зараженных ВГЕ-1, пиковые значения

АЛТ достигали 50-58 ед/л, а у зараженных ВГЕ-3 показатели АЛТ не превышали норму. Пиковые показатели АСТ у макак яванских, зараженных ВГЕ-1, достигали 75-85 ед/л (при норме АСТ до 40 ед/л), у зараженных ВГЕ-3 — 58-83 ед/л, а у зараженных парентерально ВГЕ-4 — 66-80 ед/л. У животных, зараженных ВГЕ-4 перорально, биохимические показатели оставались в норме. На протяжении всего эксперимента у всех животных не наблюдалось отклонение от нормы показателей общего анализа крови, температуры и веса тела.

Заключение. Проведенные эксперименты по заражению обезьян ВГЕ генотипов 1, 3 и 4 позволили установить длительность, клинические, вирусологические и биохимические характеристики ВГЕ-инфекции у обезьян в зависимости от генотипа вируса. Так, ВГЕ-инфекция у макак яванских, зараженных ВГЕ-1 и ВГЕ-4, сопровождалась более длительным выделением вируса и более высокими пиковыми значениями АЛТ, в отличие от животных, зараженных ВГЕ-3. Анти-ВГЕ IgG появлялись практически у всех животных примерно в одно время (4 неделя после заражения) независимо от генотипа ВГЕ, тогда как анти-ВГЕ IgM у животных, зараженных ВГЕ-3, появлялись неделю раньше, чем у животных, зараженных ВГЕ-1 и ВГЕ-4, и персистировали дольше. Наиболее выраженные изменения биохимических (АЛТ, АСТ) показателей наблюдались у обезьян, зараженных ВГЕ-4 парентерально, в то время как пероральное заражение ВГЕ-4 приводит к развитию менее продолжительной субклинической инфекции.

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ДИСПАНСЕРНОЙ ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ ПО ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Муха Т.А.^{1,2}, Ситник Т.Н.^{1,2}, Кукота И.И.¹, Веретенникова А.А.¹

¹ БУЗ ВО «Воронежский областной клинический центр профилактики и борьбы со СПИД»,

² ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, г. Воронеж

Во исполнение распоряжения Правительства РФ от 02.11.2022 г. №3306-р «Об утверждении планов мероприятий по борьбе с хроническим вирусным гепатитом С на территории Российской Федерации в период до 2030 года», Клинических рекомендаций «Хронический вирусный гепатит С», В18.2, взрослые, 2021, регламентировано определение генотипа, если планируется генотип-специфическая схема противовирусной терапии. Использование пангенотипных схем препаратами прямого противовирусного действия (ПППД) не требует генотипирования ВГС до начала лечения, но рекомендовано для людей с предшествующим неудачным лечением ХГС. При этом работа в вертикально-интегрированной медицинской информационной системе (ВИМИС) Министерства здравоохранения Российской Федерации по компоненту «Профилактическая медицина. Профилактика инфекционных болезней» разделу «Регистр больных гепатитом» требует внесения всех сведений диагностических исследований, включая генотип.

Цель исследования: оценка результатов диагностических исследований диспансерной группы пациентов для планирования охвата терапией в рамках областного плана по элиминации хронического гепатита С (ХГС).

Материалы и методы. По данным регионального сегмента федерального регистра учета хронических гепатитов проведен анализ по распространению генотипов вируса гепатита С у впервые взятых на учет пациентов за 2018-2022 г.г. (N=3391). В гендерной структуре диспансерного контингента преобладают мужчины — 62,1%.

Определение генотипов проводилось с использованием тест системы «АмплиСенс HCV-1/2/3». Субтипирование генотипов 1 и 3 проводилось только в 7-11% проб, поэтому при обобщении результатов разделение на субтипы не проведено.

Результаты. Среди включенных за 5 лет в регистр пациентов не проведено определение генотипа у 635 человек (18,7%). В динамике по годам охват обследованием на генотип увеличился до 90%.

В структуре всей когорты пациентов в равной мере были представлены генотип 1 ($M \pm m = 47,5 \pm 2,83\%$) и генотип 3 ($44,2 \pm 4,27\%$), различия статистически не значимы ($p = 0,539976$). В динамике по годам отмечалось преобладание генотипа 1 в 2019 году ($53,2\%$). На генотип 2 приходится $8,2 \pm 1,58\%$.

При распределении по полу у женщин преобладающим являлся генотип 1 ($51,3 \pm 4,64\%$), при $38,6 \pm 4,86\%$ генотипа 3 и $10,1 \pm 0,22\%$ — генотипа 2. Однако, как и в общей диспансерной группе, между генотипами 1 и 3 различия статистически не значимы ($p = 0,100664$), и к 2022 году в динамике отмечено выравнивание их доли.

В то же время у мужчин при незначительном преобладании генотипа 3 ($48,0 \pm 6,12\%$) над генотипом 1 ($44,9 \pm 3,37\%$) в среднем за 5 лет наметилась тенденция к нарастанию его доли. Наиболее редким является генотип 2 ($7,0 \pm 2,78\%$).

Стадия фиброза F0 по данным эластометрии печени выявлена у $24,0 \pm 2,32\%$ диспансерной группы, F1

— $21,6 \pm 4,46\%$, F2 — $15,0 \pm 2,21\%$, F3 — $15,2 \pm 6,39\%$, F4 — $24,1 \pm 1,79\%$. При распределении по полу стадии фиброза не отличаются от всей когорты.

Выводы. Влияние генотипа на выбор схемы лечения не актуально при использовании ПППД. Однако наличие в диспансерной группе преобладающей доли мужчин и у них — нарастание доли генотипа 3 может косвенно свидетельствовать о риске заражения их гепатитом С при употреблении психоактивных веществ, и соответственно, низкой приверженности лечению. Это потребует контроля лечения или удлинения схемы для достижения вирусологического ответа.

Для стадий фиброза F0-F2 возможно успешное применение коротких курсов ПППД. Выраженные стадии фиброза печени (F3-F4) потребуют удлинения курса, что с учетом значительной доли таких пациентов в диспансерной группе повысит затраты на лекарственные препараты.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ВАРИАНТОВ В ДЕЛЬТА-АНТИГЕНЕ НА ФОЛДИНГ БЕЛКА НУКЛЕОКАПСИДА ВИРУСА ГЕПАТИТА ДЕЛЬТА

Кузьмин О.В.¹, Карлсен А.А.^{1,2}, Михайлов М.И.^{1,2}, Кюрегян К.К.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Вирус гепатита дельта (ВГД) является инфекционным агентом, который вызывает воспалительное поражение печени. При этом для его репликации требуется присутствие вируса гепатита В (ВГВ), поскольку этот вирус-сателлит использует оболочечные белки ВГВ для формирования новых вирионов. Всего насчитывается 8 генотипов ВГД, которые отличаются по тяжести течения и скорости прогрессирования вызываемого заболевания. Геном ВГД кодирует только последовательность дельта-антигена (HDAg), который, в свою очередь, отвечает за репликацию и упаковку вирусной РНК. Однако к настоящему времени генетическая и структурная вариабельность HDAg остается сравнительно мало изученной.

Целью данного исследования являлась оценка влияния аминокислотных вариантов в HDAg на фолдинг белка нуклеокапсида ВГД разных генотипов и популяций.

В данном исследовании были использованы референсные последовательности HDAg всех восьми генотипов ВГД, а также последовательности, выделенные от 195 пациентов из трех регионов Российской Федерации: ВГД первого генотипа (ВГД-1) из Республики Тыва ($n = 125$) и Республики Дагестан ($n = 25$), а также ВГД-1 ($n = 27$) и ВГД-2 ($n = 18$) из Республики Саха. Протокол подготовки исследуемых образцов включала этапы выделения вирусной РНК из сыворотки крови, наработки кДНК, получения ампликонов и подготовки ДНК-библиотек с последующим секвенированием полного вирусного генома. Затем данные секвенирования проходили биоинформатическую обработку: очистку данных секвенирования, сборку вирусного генома, извлечение аминокислотных последовательностей

HDAg, из которых были сформированы консенсусные последовательности HDAg для каждого генотипа и региона. Фолдинг HDAg проводился с использованием программы AlphaFold 2.3.1. Для статистической оценки влияния аминокислотных вариантов на фолдинг белка был проведен дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллису.

Анализ полученных трехмерных моделей молекул HDAg показал, что все исследуемые молекулы имеют схожее строение, однако наблюдается вариабельность как между различными генотипами ВГД, так и популяциями внутри одного генотипа. Причем основные различия наблюдаются на С-конце белка со 178 по 210 аминокислотные остатки, которые заключаются в наличии или отсутствии структур в виде альфа-спирали. В данном локусе расположен сигнал ядерного экспорта, отвечающий за перенос HDAg из ядра в цитоплазму. Дисперсионный анализ показал статистически значимые различия между генотипами вируса ($\chi^2(10) = 108,03$; $p < 0,001$). При этом наиболее значимы аминокислотные замены в сигнале ядерного экспорта (NES) ($\chi^2(10) = 39,29$; $p < 0,001$) и локусе РНК-связывания (RBD) ($\chi^2(10) = 24,98$; $p = 0,005$).

В результате проведенного исследования было выявлено генетическое разнообразие ВГД в Республиках Тыва, Дагестан и Саха, отражающееся в структурных отличиях HDAg между региональными вариантами вируса. Наряду с этим была установлена локализация аминокислотных замен в HDAg, которые могут оказывать влияние на пространственную структуру и функциональные особенности белка.

ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Свирин К.А.¹, Половкова О.Г.², Кривошеина Е.И.¹, Федорова Е.С.², Камалов М.Н.², Карташов М.Ю.¹

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск, Россия

² ОГАУЗ «Томский фтизиопульмонологический медицинский центр», Томск, Россия

Актуальность. Заражение вирусом гепатита С (ВГС) пациентов, инфицированных туберкулезом (ТБ), является серьёзной проблемой современного здравоохранения. Такое коинфицирование может приводить к утяжелению течения данных заболеваний. Показано, что использование противотуберкулёзных лекарственных препаратов (изониазид, рифампицин, пиперазинамид, этамбутол, стрептомицин и др.) при сочетанном инфицировании ТБ+ВГС значительно повышает риск развития лекарственного поражения печени по сравнению с ТБ моноинфекцией. Наиболее высокая распространённость ВГС среди инфицированных ТБ наблюдается в странах Центральной Азии и Восточной Европы, в том числе и в России.

До недавнего времени пациентам с микст-инфекцией ТБ+ВГС не рекомендовалось лечение гепатита С до окончания лечения ТБ из-за иммуносупрессивного действия интерферона-α, который может увеличить вирулентность *M. tuberculosis*. На данный момент на смену интерфероновой схеме лечения ГС пришли новые противовирусные препараты прямого действия, демонстрирующие высокую эффективность и хорошую переносимость пациентами. Однако взаимодействие между лекарственными препаратами, направленными на лечение данных инфекций, остаётся не до конца изучено.

Цель данной работы состояла в определении встречаемости и молекулярно-генетической характеристики изолятов ВГС, выделенных от пациентов, инфицированных туберкулезом в Томской области.

Материалы и методы. Исследование проведено на 124 образцах сывороток/плазмы крови ТБ-инфицированных пациентов, имеющих гепатит С и проживающих на территории Томской области. Средний возраст пациентов составил 41±3,4 год; половая структура выборки — 99 (80%) мужчин и 25 (20%) женщин. Наличие РНК ВГС с последующим количественным определением проводили методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием набора реагентов HCV-FL («АмплиСенс», Россия). Генотипирование выявленных изолятов проводили путём амплификации фрагмента core гена в двухраундовой ПЦР с последующим определением нуклеотидной последовательности ампликонов методом Сенгера. Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу GenBank под номерами OR205923–OR206046.

Результаты. Филогенетический анализ показал, что 41,9% (95% ДИ: 33,6–50,7) изучаемых изолятов относятся к субгенотипу 1b; 29,8% (95% ДИ: 22,5–38,4) к субгенотипу 3a; 18,6% (95% ДИ: 12,7–26,3) к субгенотипу 1a. Среди 9,7% (95% ДИ: 33,6–50,7) исследуемых образцов

обнаружен естественный межгенотипный рекомбинант 2k/1b, получивший широкое распространение в среде потребителей инъекционных наркотиков во второй половине XX века. В работе показано достоверное различие в распределении генотипов ВГС среди больных туберкулезом мужчин и женщин. Так среди ТБ-больных мужского пола доминирующим субгенотипом (44%) является 1b, на долю субгенотипов 3a и 1a приходится 24% и 21% соответственно. Среди инфицированных женщин доминируют субгенотипы 3a (52%) и 1b (32%), субгенотип 1a является минорным (8%). Распределение генотипов связывают с различными путями передачи ВГС-инфекции. Традиционно субгенотипы 1a и 3a связывают с употреблением наркотиков, в то время как субгенотип 1b чаще передаётся с продуктами крови посредством медицинских процедур. Интенсивное распространение субгенотипа 3a в нашей стране связывают с его проникновением в среду инъекционных наркоманов в 1980-е гг. из стран Центральной и Юго-Восточной Азии. Достоверных различий в уровне вирусной нагрузки, отражающей репликативную активность ВГС, у пациентов с различными генотипами на данной выборке обнаружить не удалось.

Полученные нами результаты о распределении субгенотипов совпадают с литературными данными о встречаемости субгенотипов ВГС на территории Сибирского федерального округа. Ряд исследований подтверждают влияние генотипа ВГС на тяжесть течения инфекции ГС и скорость развития заболевания. Предполагается, что субгенотип 1b связан с более тяжёлым течением заболевания и быстрым развитием декомпенсированного цирроза печени, в то время как генотип 3 ассоциируют с увеличенным риском прогрессирования фиброза и стеатоза печени. Считается, что при лечении классической схемой пегилированным интерфероном-α2 и рибавирином пациенты, инфицированные вирусом 1-го генотипа, реже достигают устойчивого вирусологического ответа на терапию, чем больные с ВГС 2-го и 3-го генотипов.

Заключение. Актуализация данных по генотипическому разнообразию изолятов ВГС среди различных групп населения позволяет отслеживать пути передачи, появления и распространения на территории России новых генетических вариантов ВГС. Высокая инфицированность ВГС больных туберкулезом определяет необходимость строгого соблюдения противоэпидемического режима в отношении возможного госпитального заражения ВГС-инфекцией.

Исследование проведено в рамках ГЗ-2/22 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (№ 122040600156-3 в ЕГИСУ НИОКТР).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ЛИОФИЛЬНОЙ СУШКИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

Мороз А.С.^{1,2}, Идутова М.К.², Лисок А.В.², Аронова Е.Б.¹, Большаков В.Н.²

¹ ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО «СПбПУ»), Санкт-Петербург, Россия

² ГК «Алкор Био», Санкт-Петербург, Россия

Введение. В последние десятилетия фармацевтическая индустрия столкнулась с рядом вызовов в разработке и производстве стабильных и эффективных лекарственных препаратов, а также диагностических тест-систем. Одной из таких проблем является сохранение активности и стабильности биологических молекул в условиях транспортировки и последующего хранения; в особенности это касается ферментов, которые используются в полимеразной цепной реакции (ПЦР). В этой работе мы рассмотрим одну из современных технологий, которая предлагает решение этой проблемы — использование лиофильной сушки для приготовления ПЦР-смеси тест-системы для диагностики вируса гепатита В. Этот процесс обеспечивает сохранение стабильности и активности биологических молекул, при транспортировке и хранении полученных лиофилизатов.

За последние несколько десятилетий гепатит В стал одним из наиболее распространенных вирусных заболеваний в мире, и разработка эффективной, чувствительной и стабильной диагностической ПЦР-системы, является одной из приоритетных задач в борьбе с этой инфекцией.

Цель исследования — отработка метода лиофилизации готовой ПЦР-смеси для диагностики вируса гепатита В.

Основные задачи, которые решались в процессе работы, заключались в подборе оптимального соотношения компонентов ПЦР-смеси, выборе состава композита для лиофильной сушки и тестировании полученных лиофилизатов на клинических образцах.

Материалы и методы. При проведении процесса лиофилизации использовался сублиматор модели 100-5 (Zirbus-technology GmbH, Германия). Для оптимизации процесса лиофильной сушки проводился подбор состава композита как на основе литературных данных, так и экспериментально. Композит при лиофильной сушке занимает основной объём реакционной смеси. Очень важно было подобрать такой состав, чтобы компоненты композита не ингибировали протекание ПЦР. При этом необходимо, чтобы композит обеспечивал образование правильной структуры лиофилизата при длительном воздействии низких температур в процессе лиофилизации. При подборе композита было проведено титрование таких ключевых компонентов в составе композита, как трегалоза, желатин и декстран. В качестве фермента в реакционной смеси использовалась безглицериновая Taq-полимераза, приготовленная в трегалозном буфере, поскольку глицерин хорошо удерживает влагу, что абсолютно неприемлемо для процесса низкотемпературной сушки. После подбора

композита и избавления от глицерина в смеси, необходимо было подтвердить, что система работает стабильно, сохраняется чувствительность праймеров и полимеразы способна функционировать после длительного воздействия низкой температуры. Сначала были проверены маленькие объёмы ПЦР-смеси, затем было проведено масштабирование процесса, в ходе которого были высушены и проверены большие объёмы реакционной смеси. Для оценки качества полученных лиофилизатов и контроля качества исходных ПЦР-смесей использовался метод ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США).

Основные результаты. Были проверены различные длительности процесса лиофилизации (от 2 суток до 7 суток), различные режимы создания вакуума, использование предварительного охлаждения полок лиофильной камеры, возможность досушивания лиофилизатов при комнатной температуре.

Оптимальным вариантом проведения процесса лиофилизации оказался протокол с предварительным промораживанием полок лиофильной камеры, выдерживанием смесей при фиксированной низкой температуре с последующим повышением температуры с шагом 5°C в течение 36 часов.

Длительность всего процесса составляет около 48 часов. После каждой лиофильной сушки проводился контроль качества полученных лиофилизатов методом ПЦР в реальном времени. В качестве контроля использовалась разработанная ранее ПЦР-смесь, в составе которой нет композита и присутствует глицерин. Выявлено, что оба варианта смесей работают с одинаковой эффективностью. Также, в данный момент проводится проверка стабильности полученных лиофилизатов при хранении при разных температурах. На данный момент завершён этап хранения лиофилизатов при +37°C в течение 25 дней, а также при +25°C в течение 70 дней, проверка стабильности завершилась успешно.

Заключение. В ходе данной работы для тест-системы диагностики вируса гепатита В был проведён подбор состава композита для лиофильной сушки ПЦР-смеси и оптимизирован протокол проведения процесса лиофилизации, осуществлена оценка качества лиофилизатов методом ПЦР в реальном времени при сравнении с контрольной, нелиофилизированной смесью. Это позволит производить тест-систему для диагностики вируса гепатита В, которая будет более стабильна при различных условиях транспортировки и хранения.

Раздел 2. ВПЧ-ТЕСТИРОВАНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

ВЛИЯНИЕ COVID 19 НА ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО СКРИНИНГА, РАННЮЮ ДИАГНОСТИКУ, ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ И СМЕРТНОСТЬ ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ У ЖЕНЩИН В РЕСПУБЛИКЕ КАРЕЛИЯ

Ковчур П.И.^{1,2}, Хидишян И.В.²

¹ ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

² ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», Петрозаводск

Актуальной задачей для гинекологов и онкогинекологов России является снижение смертности от рака шейки матки (РШМ). Решение проблемы состоит в решении 2 задач: организация цитологического скрининга (ЦС) женского населения Республики Карелия (с охватом не менее 70-80%). Вторая задача — усовершенствование методов лечения инвазивных форм РШМ. Сегодня в России скрининговые мероприятия проводятся только в рамках реализации приказа Минздрава России от 16.12.2021 №2041 «Об утверждении порядка проведения профилактического медицинского осмотра и диспансеризации определенных групп взрослого населения», приказа МЗ РК от 4.02.2020г №131 «О проведении скрининговых мероприятий по раннему выявлению онкологических заболеваний в медицинских организациях Республики Карелия». Организованных (популяционных) программ скрининга на территории РК не проводится. Напомню, что в зарубежных странах с 2003 года скрининг с одновременным использованием ВПЧ теста и ПАП теста является альтернативой цитологическому скринингу у женщин старше 30 лет.

Цель. Оценить раннюю диагностику, включая диагностику рака *in situ* шейки матки, заболеваемость и смертность от РШМ среди женщин Республики Карелия (РК).

Материалы и методы исследования. Проведен анализ материала от 770 пациенток с раком *in situ* и 1912 инвазивным РШМ за 25-летний период (1998-2022 гг). Выделено 5 периодов: I — 1998-2002 гг., II — 2003-2007 гг., III — 2008-2012 гг., IV — 2013-2017гг., V — 2018-2022гг (с 2019 по 2021гг. согласно распоряжению Правительства Российской Федерации всероссийская диспансеризация населения была приостановлена в связи с COVID-19 в стране).

Результаты и обсуждение. В Республике Карелия за 1998-2022 годы выявлен значительный рост «грубого» показателя заболеваемости РШМ с 10,8 (1998г) до 39,85 (2010г) на 100 тыс. женского населения. Далее отмечено снижение «грубого» показателя до 22,6 (2022г) на 100 тыс. женского населения и снижение стандартизованного показателя с 31,58 до 14,63 на 100 тыс. населения. Показатель смертности от РШМ в РК варьирует от 4,1 до 10,1 случаев на 100 тыс. женского населения. Зарегистрирован рост «грубого» показателя смертности с 4,6 (1998) до 8,8 (2022г) на 100 тыс. женского населения, и увеличение стандартизованного показателя с 4,42 до 5,4 на 100 тыс. женского населения. Доля выявленных на I-II стадии случаев

РШМ с 1998 г (66,1%) увеличивалась до 2017 года (72,7%). С 66,1% (1998-2002гг), 68,5% (2003-2007), 77,4% (2008-2012), 73,3% (2013-2017), а 2018-2022гг — снижение до 46,8% и рост доли выявленных на III-IV стадии случаев РШМ с 17,3% до 53,2%. Частота III-IV стадии (абс.ч) при РШМ составила 15,8±5,8 случаев (1998-2002гг), 24,6±2,5 (2003-2007), 28,2±4,3 (2008-2012), 22,3±3,1 (2013-2017), 31±2 (2018-2022). В период пандемии COVID-19 (2019-2021гг) из 194 случаев 99 (51,03%) диагностировано в 3-4 стадии РШМ. Таким образом, РШМ выявлялся уже при наличии признаков заболевания и обращении пациенток к гинекологу по месту жительства при отсутствии проведения ЦС. В 2022 году в РК диагностировано 72 случая инвазивных форм [I стадия — 25 (32,5%) случаев, II — 16 (20,8%), III — 22 (28,6%) и IV — 9 (11,7%)] и всего 5 (6,5%) случаев рака *in situ*. То есть, отмечено повышение ранней диагностики удельного веса до 56,9% (41) по сравнению с «пандемийной» диагностикой. Анализ данных о больных с преинвазивным РШМ позволяет оценить уровень ранней диагностики РШМ в условиях женских консультаций за счет организации ЦС, что ведет к снижению удельного веса инвазивного РШМ в структуре онкозаболеваний у женщин и снижению смертности от РШМ. Рассматривая отношение частоты рака *in situ* к инвазивным формам РШМ в РК мы видим увеличение диагностики рака *in situ* с 1998г по 2017годы с 24,4% (1998-2002гг), 33,2% (2003-2007гг), 62,8% (2008-2012), 82,4% (2013-2017гг), и резкое снижение до 16,4% (2019-2022гг). Этим фактом можно объяснить снижение удельного веса инвазивного РШМ в структуре онкологических заболеваний у женщин за 1998-2022гг в РК со 2 места (1998-2002гг) на 9 место (2018-2022гг). При этом фактором, определяющим эффективность проведения ЦС является охват женского населения, который составил за 2021-2022 гг от 7,1% до 16,3%, в сравнении с 2013-2017гг, когда охват ЦС составил в среднем 43-46% по г. Петрозаводску и району РК. Фактическую запущенность опухолевого процесса, а также качество лечения более достоверно характеризует показатель одногодичной летальности. В 2022 году показатель одногодичной летальности от рака шейки матки составил 14,5. В динамике отмечается рост показателя с 5,7 в 2010 г. до 14,5 в 2022 году. Доля состоящих на учёте 5 лет и более с диагнозом РШМ на 2022 год составила 79,4%. В динамике отмечается рост данного показателя с 57,7% до 79,4% на 100тыс женского населения.

Выводы:

1. Анализ опыта проведения скрининговых мероприятий в рамках проведения профилактического медицинского осмотра и диспансеризации женщин в Республике Карелия за 1998-2018гг показал снижение показателя заболеваемости РШМ и рост показателя доли состоящих с РШМ на учете 5 лет и более. Однако за последние 3 года отмечается рост заболеваемости РШМ, снижение доли выявленных на I-II стадии, рост доли выявленных на III-IV стадии заболевания, рост показателей смертности и показателя одногодичной летальности.

2. Резкое уменьшение доли выявленных заболеваний на I-II стадии РШМ, рост доли случаев, выявленных на III-IV стадии, рост показателей смертности и одногодичной летальности за 2018-2022гг, прежде всего, связан с отсутствием диспансеризации пациентов и проведения скрининговых мероприятий в РК.

3. В Республике Карелия целесообразно создание и реализация отдельной государственной комплексной

программы «Скрининг рака шейки матки» с выделением соответствующего финансирования в рамках диспансеризации с охватом населения не менее 70% от целевой группы (Михетько А.А., Ковчур П.И., 2011, 2017гг) в Республике Карелия.

4. Определяющим в проведении ЦС является охват женского населения (не менее 70-80%) с компьютерной базой данных учета пациенток в рамках данной программы, подлежащих ЦС в ЦЦЛ Карельского РОД и лабораториях ЦРБ РК.

5. Следует учитывать, что проведение скрининговых мероприятий только в рамках реализации приказа Минздрава России от 16.12.2021 №2041 «Об утверждении порядка проведения профилактического медицинского осмотра и диспансеризации определенных групп взрослого населения» в Республики Карелия позволяет охватить около 40% женщин целевой группы, что не обеспечивает понятие «скрининг» РШМ.

ВЫЯВЛЕНИЕ E7 ГЕНОВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 И 18 ТИПА У ПАЦИЕНТОВ С ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ МЕТОДОМ ПЦР-РВ

Костюк С.А.¹, Пинчук Т.В.², Полуян О.С.¹, Можейко Л.Ф.², Лямцева А.К.¹

¹ Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (ГУО «БелМАПО»), Минск, Республика Беларусь

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет» (УО «БГМУ»), Минск, Республика Беларусь

Введение. Ведущая роль в развитии интраэпителиальных поражений шейки матки принадлежит вирусу папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР), длительная персистенция которого приводит к клеточным изменениям, характерным для предрака и рака шейки матки. Однако персистирующий характер ВПЧ-инфекция приобретает лишь у 10-15% пациенток, тогда как у большинства женщин, инфицированных ВПЧ ВКР, элиминация вируса происходит самостоятельно в течение 2 лет. В настоящее время не установлено достоверных маркеров, позволяющих проводить оценку предрасположенности конкретного пациента к развитию цервикальных интраэпителиальных поражений, прогнозировать вариант течения и исход заболевания. Неоднозначность течения ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки требует разработки риск-ориентированного подхода к менеджменту пациентов с такой патологией.

Цель исследования. Выявить и определить количественно гены E7 ВПЧ 16, 18 типов в соскобах эпителиальных клеток женщин с цервикальными интраэпителиальными поражениями методом ПЦР-РВ и установить особенности их амплификации при различных цитологических заключениях.

Материалы и методы. Научные исследования проводились на базе кафедры акушерства и гинекологии УО «БГМУ» и группы ПЦР-диагностики Научно-исследовательской лаборатории ГУО «БелМАПО» с применением автор-

ской методики ПЦР для определения РНК ВПЧ 16 и 18 типов. Основную группу составили 36 пациенток, инфицированных ВПЧ 16, 18 типов, что было подтверждено с использованием тест-системы «АмплиСенс ВПЧ ВКР Скрин-FL» (РФ). Женщины данной группы были разделены по результатам цитологического исследования на 3 группы: 1 группу составили 12 пациенток с отсутствием патологических изменений в цитологических мазках; 2 группу — 12 женщин с наличием в цитологических мазках интраэпителиальных поражений шейки матки низкой степени; 3 группу — 12 пациенток с цитологически выявленными интраэпителиальными поражениями шейки матки высокой степени и гистологически подтвержденной дисплазией шейки матки 2 степени. Биологическим материалом для исследований явились соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала.

В ходе исследования были разработаны методики ПЦР-РВ для количественного определения ДНК ВПЧ-16,18 в типоспецифичной количественной TaqMan ПЦР-РВ с использованием праймеров для амплификации E7 гена и ДНК β-глобинового гена (вирусная нагрузка), количественного соотношения ДНК E2 и E6 для ВПЧ-16,18 как маркера персистенции вируса. Далее оценивалась взаимосвязь между выраженностью цито и гистологических предраковых изменений в шейке матки и указанными лабораторными критериями. Выделение ДНК из биологического материала проводили с использованием набора реагентов «АртДНК

MiniSpin» («АртБиоТех», РБ). Постановка реакции осуществлялась в общем объеме раствора 25 мкл, содержащем 50 пмоль каждого из праймеров и олигонуклеотидных зондов, 10х-кратный Taq буфер, смесь дНТФ, 2 мкл тестируемой ДНК, 0,5 мкл Taq ДНК-полимеразы. После 2-минутного этапа денатурации при 94°C проводилось 40 циклов амплификации: денатурация — 1 минута при 94°C, отжиг праймеров — 2 минуты при 40°C, элонгация — 1,5 минуты при 72°C. При постановке реакции были использованы оригинальные праймеры: ВПЧ-16 Е7: 5'-CCGGACAGAGCCCATACAAT-3' (прямой), 5'-ACGTGTGTGCTTTGTACGCAC-3' (обратный); ВПЧ-18 Е7: 5'-GACTCAGAGGAAGAAAACGATGAAA-3' (прямой), 5'-GTGACGTTGTGGTTCGGCT-3' (обратный), β -глобиновый ген: 5'-GACAGGTACGGCTGCATCA-3' (прямой), 5'-TAGATGGCTCTGCCCTGACT5-3' (обратный). При проведении ПЦР-РВ использовались меченые флуоресцентным агентом TaqMan оригинальные олигонуклеотидные зонды, комплементарные участку ПЦР-продукта: ВПЧ-16 Е7-5' FAM-TGTTGCAAGTGTGACTCTACGTTCCGGT-TAMRA3', ВПЧ-18 Е7-5' FAM-TGGAGTTAATCATCAACATTTACCA-TAMRA3', β -глобин-5' JOE-CTAGGGTTGGCCAATCTACTCCCAGTAMRA3'. Концентрация ДНК генов в клинических образцах рассчитывалась по калибровочному графику зависимости уровня нарастания флуоресценции в процессе амплификации образца от концентрации ДНК генов в калибровочных пробах, рассчитанного с использованием программного обеспечения RotorGene-6000 («Corbett Research», Австралия). Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи программы «STATISTICA 8.0». При уровне значимости $p < 0,05$ различия считались статистически достоверными. Для описания частот выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения.

Результаты. Для проведения количественного анализа ДНК Е7 ВПЧ-16,18 и внутреннего контрольного образца (ДНК β -глобинового гена) использовалась ПЦР-РВ для получения соотношения количества вирусной ДНК на одну клетку человека. Концентрация ДНК генов была пропорциональна уровню нарастания флуоресценции в процессе амплификации образца.

Использование внутреннего контроля позволяло отследить кинетику реакции, определить аналитические характеристики реакции, произвести расчет количества ДНК Е7 ВПЧ-16,18 на 1 клетку эпителия человека в биологическом материале.

Корреляции между пороговым циклом СТ (значение цикла при котором пороговая линия и кривая амплификации пересекаются) и \log_{10} концентрации копий фрагмента ДНК Е7 ВПЧ-16 и ДНК Е7 ВПЧ-18 составили $R^2 > 0,98$. Значения концентраций ДНК Е7 ВПЧ-16 и ДНК Е7 ВПЧ-18 в биологическом материале высчитывалось автоматически.

В ходе исследования были получены следующие результаты: количество ДНК гена Е7 ВПЧ-16 и ВПЧ-18 в биологическом материале у женщин с цитологической нормой на фоне инфицирования ВПЧ составила $682,2 \pm 368,3$ и $883,1 \pm 465,1$ копий на 1 клетку человека соответственно; при цервикальных интраэпителиальных поражениях низкой степени — $2756,9 \pm 1138,5$ и $2423,2 \pm 876,8$ копий на 1 клетку человека соответственно; при цервикальных интраэпителиальных поражениях высокой степени — $6233,9 \pm 2076,3$ и $5915,3 \pm 1875,5$ копий на 1 клетку эпителия человека соответственно.

Выводы. Существует статистически достоверное различие между вирусной нагрузкой ВПЧ-16 и ВПЧ-18 у женщин, инфицированных ВПЧ без клинических проявлений на шейке матки и у инфицированных пациенток с наличием ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки ($p < 0,05$ для сравнения между группами 1 и 2, 1 и 3). В то же время, наблюдаются различия вирусной нагрузки между 2 и 3 группами, анализ достоверности этих различий показал статистически значимых результатов ($p < 0,05$). Динамика накопления вируса в инфицированной ткани имеет уровень насыщения, поэтому в 2 и 3 группах, где вирусная нагрузка более высокая, количество копий ДНК вируса на одну клетку достоверно превышает таковое в 1 группе, где этот показатель еще находится в фазе экспоненциального роста. Поскольку при простом исследовании вирусной нагрузки методом ПЦР-РВ оценить характер внутриклеточного существования ВПЧ не представляется возможным, данная методика не позволяет оценить персистенцию для папилломавирусной инфекции.

СРАВНЕНИЕ ПЦР-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 И 18 ТИПА

Никитина В.А.¹, Вязовая А.А.², Холопов Д.В.², Топузов Э.Э.³, Лялина Л.В.², Ермаченко Е.Д.¹, Лисок А.В.¹

¹ ООО «Компания Алкор Био» Санкт-Петербург, Россия

² ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

³ СПб ГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Вирус папилломы человека (ВПЧ) относится к малым ДНК-содержащим вирусам, которые инфицируют эпителиальные клетки и индуцируют пролиферативные поражения кожи и слизистых оболочек. ВПЧ способен существовать как в свободной (эписомальной), так и в интегрированной формах. Интеграция вируса сопровождается потерей E1/E2 области генома, а также имеются данные о

потере области L1 в процессе интеграции. Для ПЦР диагностики ВПЧ в качестве мишеней используют области L1, E1, E6, E7, поскольку они являются наиболее консервативными.

Цель: сравнение двух разработанных систем праймер-зонд для выявления вируса папилломы человека 16 и 18 типов, нацеленных на участки вирусного генома E6 и L1.

Материалы и методы. Материалом для исследования были 37 образцов тканей пациентов со злокачественными новообразованиями различных локализаций. Детекцию ВПЧ 16 и 18 типов проводили методом ПЦР в режиме «реального времени» на анализаторе CFX96 Real-Time detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) двумя разработанными тест-системами, нацеленными на участки E6 и L1 соответственно, с подобранными и оптимизированными концентрациями праймеров и зондов. В качестве эндогенного контроля, позволяющего оценить качество забора материала, транспортировки, хранения и всех этапов пробоподготовки, использовали ген человека. ДНК ВПЧ 16 типа определяли по наличию сигнала по каналу Orange/ROX, ДНК ВПЧ 18 типа

— Yellow/HEX и ДНК человека — Green/FAM. Для сравнения результатов, полученных при выявлении и генотипировании вируса, использовали наборы реагентов «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) и «ВПЧ-ГЕН-16/18» (ООО «ДНК-Технология», Москва).

Результаты.

Данные тестирования показали в 37 образцах тканей пациентов со злокачественными новообразованиями различных локализаций наличие ДНК ВПЧ 16 и 18 типов. Дискордантные результаты получены для 3 образцов (табл.1), для которых клиническая значимость составляла менее 3 Ig ВПЧ/ 10⁴ клеток.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ НА ВПЧ 16 И 18 ТИПОВ

	Значения C _q			
	E6	L1	АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL	ВПЧ-ГЕН-16/18
Образец 1 (16ВПЧ)	N/A	31.47	30.56	N/A
Образец 2 (18ВПЧ)	35.42	N/A	30.89	N/A
Образец 3 (16ВПЧ)	N/A	33.61	31.40	39.80

Дискордантные результаты получены для двух образцов при исследовании их на ВПЧ 16 типа и для одного образца — на ВПЧ 18 типа. Дискордантные результаты соответствовали выходу кривой амплификации после 30 цикла для каждой из использованных систем.

Эти образцы, положительные на ВПЧ 16 типа, не определились системой, нацеленной на E6 область, и в одном случае был также не выявлен 18 тип при использовании системы, нацеленной на L1 область генома ВПЧ.

Выводы. Приведенные данные показывают, что для образцов с низким содержанием нуклеиновых кислот искомого вируса, различия в чувствительности диагностических систем, основанных на методе ПЦР, могут являться причиной постановки некорректного диагноза. Эти различия, возможно, обусловлены в том числе выбором участка генома вируса, используемого в качестве мишени для проведения молекулярной диагностики.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА У ПАЦИЕНТОК С ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМОЙ ШЕЙКИ МАТКИ И ВУЛЬВЫ: ЕСТЬ ЛИ РАЗЛИЧИЯ?

Пахарукова М.И.^{1,2}, Юшков Б.Г.², Кузнецова Е.А.¹

¹ Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Клинико-диагностический центр город Екатеринбург», Екатеринбург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт иммунологии и физиологии Уральское отделение Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

Введение. Установлено, что вирус папилломы человека (ВПЧ) является главным этиологическим фактором канцерогенеза шейки матки (Zur Hausen, 2002). Патогенез плоскоклеточной карциномы вульвы (ПКВ) менее изучен ввиду её редкой встречаемости. В последние десятилетия стало известно, что ПКВ являются преимущественно ВПЧ-независимыми (de Sanjosé, 2013; Faber, 2017; Kortekaas, 2020; Woelber, 2021). Не изученным остается вопрос сравнения спектра генотипов ВПЧ вызывающих ВПЧ-ассоциированные карциномы шейки матки и вульвы.

Цель исследования: Определить частоту выявления ВПЧ, доминантные типы, вирусную нагрузку и частоту полиинфекции при плоскоклеточном раке наружных половых органов в сравнении с карциномой шейки матки и группами здоровых пациенток

Материалы и методы. В исследование ретроспективно были включены 74 пациентки, обследованных в ГАУЗ СО СООД в период с 2016 по 2021 год с впервые выявленным ПКВ. Возраст обследуемых составил 71 ± 12 год (95% ДИ 68-74). Материалом служили парафиновые блоки с биопсийным или операционным материалом.

Проводилось ИГХ исследование; качественное определение антигена p16INK4a выполнялось с помощью набора реагентов CINtec® Histology (клон Е6Н4); антигена p53 с помощью набора реагентов Cell Marque (клон DO-7). Группа обследуемых с верифицированной карциномой шейки матки составили 32 пациентки (возраст 46 лет Q1 — Q3 39-58). Группы здоровых пациенток, без гинекологической патологии составили 59 человек (материал, полученный с шейки матки), возраст 36 лет Q1 — Q3 30-45; 55 человек (материал, полученный с вульвы), возраст 67 лет Q1 — Q3 60-76. Типирование ВПЧ ВКР проводили методом ПЦР-realtime с использованием набора реагентов «АмплиСенсО ВПЧ ВКР генотип-FL». Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 3.1.6.

Результаты. Анализ полученных данных позволил установить — частота встречаемости ВПЧ-ассоциирован-

ной ПКВ составляет 28,4 % (n=21). Распространённость ДНК ВПЧ среди всех обследованных нами пациенток с ПКВ составила 45,9 % (n=34). Таким образом, в 13 случаях ВПЧ-независимых карцином было обнаружено ДНК ВПЧ. Распространённость ВПЧ в группах здоровых пациенток составила 36,4 % (материал с вульвы) и 52,5 % (материал с шейки матки). Во всех образцах карцином шейки матки была обнаружена ДНК ВПЧ. Наиболее распространённым генотипом у здоровых пациенток является 6 генотип (материал с вульвы). Во всех остальных группах доминирующим типом был 16. При этом в ВПЧ-ассоциированной карциноме вульвы 16 генотип обнаруживался статистически значимо чаще по сравнению с карциномой шейки матки ($p=0,048$). Нами не было обнаружено статистически значимых различий в частоте встречаемости полиинфекции в анализируемых группах ($p=0,537$). Результаты представлены в таблице.

ТАБЛИЦА. ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНОТИПОВ ВПЧ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ВУЛЬВЫ В СРАВНЕНИИ С КАРЦИНОМОЙ ШЕЙКИ МАТКИ И ГРУППАМИ ЗДОРОВЫХ ПАЦИЕНТОК

	Вульва			Шейка матки		p-value
	1. Группа здоровых n=55	2. ВПЧ-независим. карцинома n=53	3. ВПЧ-ассоциир. карцинома n=21	4. Группа здоровых n=59	5. Карцинома n=32	
ДНК ВПЧ обнаруж	20 (36,4 %)	13 (24,5%)	21 (100,0%)	31 (52,5%)	32 (100,0%)	< 0,001*
Генотип						
6	8 (14,5%)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,036*
11	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,8%)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,129
16	3 (5,5%)	9 (17,0%)	19 (90,5%)	12 (20,3%)	18 (56,2%)	< 0,001*
18	1 (1,8%)	0 (0,0)	1 (4,8%)	5 (8,5%)	6 (18,8%)	0,005*
31	2 (3,6%)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (5,1%)	3 (9,4%)	0,929
33	2 (3,6%)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,7%)	2 (6,2%)	0,258
35	1 (1,8%)	1 (1,9%)	1 (4,8%)	1 (1,7%)	1 (3,1%)	0,852
39	2 (3,6%)	1 (1,9%)	1 (4,8%)	3 (5,1%)	1 (3,1%)	0,949
45	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (5,1%)	4 (12,5%)	0,014*
51	1 (1,8%)	0 (0,0)	1 (4,8%)	2 (3,4%)	0 (0,0)	0,650
52	0 (0,0)	1 (1,9%)	1 (4,8%)	5 (8,5%)	2 (6,2%)	0,238
56	0 (0,0)	3 (5,7%)	0 (0,0)	3 (5,1%)	2 (6,2%)	0,456
58	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,1%)	0,658
66	1 (1,8%)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,7%)	0 (0,0)	0,774
68	1 (1,8%)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,7%)	0 (0,0)	0,898
Поли-инфекция	2 (10,0%)	3 (23,1%)	3 (14,3%)	7 (23,3%)	8 (25,0%)	0,537

* — различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

Значения вирусной нагрузки (Ig на 100 тыс. клеток) были статистически значимо выше ($p < 0,001$) в группах ВПЧ-ассоциированной карциномы вульвы и шейки матки (6 ± 1 (95% ДИ 6-7) и 6 ± 1 (95% ДИ 6-6) соответственно) по сравнению с группами здоровых пациенток (3 ± 2 (95% ДИ 2-4) в материале полученном с вульвы и 4 ± 2 (95% ДИ 3-5) с шейки матки) и значением вирусной нагрузки ДНК ВПЧ, обнаруженной при ВПЧ-независимой карциноме (3 ± 2 (95% ДИ 2-4)).

Заключение. Плоскоклеточная карциномы вульвы преимущественно ВПЧ-независимая (71,6%). Полученные нами данные показывают более широкий спектр генотипов ВПЧ, обнаруживаемый у пациенток с ВПЧ-ассоциированной плоскоклеточной карциномой шейки матки, по сравнению с ВПЧ-ассоциированной карциномой вульвы, где доминирующим типом (более 90%) является 16 генотип. При этом значения вирусной нагрузки и частота полиинфекции не различаются.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПОПУЛЯЦИОННОГО СКРИНИНГА РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Логинава О.П., Шевченко Н.И., Воропаева А.В.

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», г. Гомель, Республика Беларусь

Проблема рака шейки матки (РШМ) в течение многих десятилетий продолжает оставаться в центре внимания ведущих зарубежных и отечественных онкологов. Злокачественные опухоли шейки матки занимают лидирующую позицию среди злокачественных новообразований органов репродуктивной системы у женщин, уступая лишь раку молочной железы, несмотря на наличие гораздо более эффективного скрининга (Каприн А.Д. и соавт., 2015). Учитывая значительную связь между наличием ВПЧ и высоким риском развития цервикальных неоплазий, изучение этиопатогенетических аспектов, исследование эпидемиологии, профилактики, диагностики и лечения папилломавирусной инфекции является одним из приоритетных направлений современной медицинской науки (Абрамовских, О. С., 2016).

Цель исследования: оценить результаты скрининга рака шейки матки в Гомельской области по результатам совместного белорусско-итальянского проекта.

Материал и методы. Для получения эпидемиологических данных по заболеваемости раком шейки матки в Гомельской области использовалась информация Белорусского канцер-регистра за 2001-2019 гг. Были рассмотрены и проанализированы показатели заболеваемости (грубые интенсивные (CR) и повозрастные (AsR)) РШМ на 100 000 населения. Для оценки динамики показателей использовался среднегодовой темп прироста (APC), рассчитанный на основе экспоненциальной модели регрессии. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Объектом исследования явились 11262 женщины 4 районов Гомельской области: Чечерского, Добрушского, Хойникского и Ветковского, которые были включены в программу скрининга рака шейки матки. Возраст женщин от 18 до 55 лет. Материалом для исследования послужили соскобы из цервикального канала шейки матки. Взятие материала проводилось с помощью цервикальной цитощетки в виалу с транспортной средой для жидкостной цитологии. Цитологическое исследование проводилось с окраской по Папаниколау с использованием автоматического стейнера.

Детекция и генотипирование вируса папилломы человека выполняли методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием наборов

реагентов Abbott Real Time HPV(США) с гибридационной-флюоресцентной детекцией. Эти наборы рекомендованы ВОЗ для проведения скрининговых исследований по выявлению вируса папилломы человека высокого онкогенного риска. Выделение ДНК осуществлялось в автоматическом режиме с использованием роботизированной системы пробоподготовки ms2000sp, амплификация и детекция проводилась в режиме реального времени с использованием амплификатора ms2000rt. В результате исследования определялись ВПЧ 16, 18 и других генотипов высокого онкогенного риска. Все исследования осуществлялись в рамках совместного белорусско-итальянского проекта «Разработать и внедрить алгоритм скрининговых мероприятий по раннему выявлению рака шейки матки» (Ротари клуб «Адда Лодиджано-Италия»).

Результаты и обсуждение. В структуре заболеваемости женщин Гомельской области злокачественные опухоли шейки матки в 2019 году занимали 10 ранговое место и составляли 2,65%. В течение всего периода наблюдения с 2001 по 2019 гг. наблюдалось увеличение числа ежегодно заболевших РШМ на территории Гомельской области и лишь в 2018-19 гг отмечено незначительное снижение заболеваемости РШМ. Так, число ежегодно регистрируемых новых случаев заболевания в 2001 году составило 131 случай, а в 2019 — 116 случаев. За период с 2001 по 2019 годы в Гомельской области зарегистрировано 2776 случаев РШМ.

Существенных изменений в темпах прироста (APC) заболеваемости на территории Гомельской области не отмечалось $APC = -0,9 (-1,88-0,06)\%$. При детальном рассмотрении темпов прироста за исследуемый период наблюдалось снижение $APC = -2,2 (-3,39--1,04)\%*$ за счет городских жителей и увеличение $APC = -2,3 (0,53-4,03)\%*$ у сельских жителей Гомельской области. В Гомельской области в период с 2010 по 2019 гг. заболеваемость злокачественными опухолями шейки матки не имеет тенденции к снижению, а, напротив, находится на стабильно высоком уровне, особенно в районах, пострадавших от аварии на ЧАЭС. Грубый интенсивный показатель заболеваемости РШМ по районам области находился в пределах от 10,1‰ в Светлогорском районе до 30,3‰ в Брагинском районе.

Рост заболеваемости отмечен в основном у молодых женщин детородного возраста, в том числе в возрастной группе моложе 30 лет. С 25-летнего возраста заболеваемость РШМ резко увеличивается, достигая максимума в возрастной группе 35-39 лет (30,4‰), т.е. повышается в группе женщин репродуктивного возраста. Увеличение заболеваемости в данной возрастной группе свидетельствует о возможном инфицировании ВПЧ в 20-25 лет. Полученные данные позволяют установить возраст для начала скрининга РШМ, а также обуславливают более активное внедрение программ первичной профилактики.

По результатам изучения эпидемиологической ситуации цитологический скрининг выполнен в четырех районах Гомельской области. В результате проведения цитологических исследований методом жидкостной цитологии установлено, что в 95,9% случаев патологических изменений в шейке матки не выявлено. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии различной степени (ASC-US, LSIL, HSIL) установлены у 459 женщин, что составило 4,1%. Частота выявленных патологических результатов цитологии в четырех исследуемых районах распределилась следующим образом: 4,46% в Хойникском районе, 4,24% — в Ветковском, 3,53% — в Добрушском, 4,82% — в Чечерском районах.

Дисплазия высокой степени относится к предраковым состояниям и представляет наибольшую значимость. Такая патология детектирована в 94 образцах, что составило

20,5% от выявленной патологии. Из них наибольший удельный вес HSIL (44,5%) выявлен в возрастной группе 25-39 лет, что указывает на высокую частоту встречаемости предопухолевых заболеваний шейки матки у женщин молодого возраста. Особое значение приобретает обнаружение HSIL в возрасте 18-24 года — 14,6% от всей выявленной патологии в этом возрасте. HSIL относится к облигатному предраку шейки матки, что требует проведения лечения и динамического наблюдения для этой категории пациенток.

Согласно проведенному ПЦР-исследованию отрицательный результат на ВПЧ ВКР установлен в 9566(91,2%) образцах, а положительный в 922(8,8%) образцах. В структуре общей инфицированности ВПЧ ВКР 16 тип выявлен в 291 случае, что составило 2,8%, 18 тип — в 77(0,73%), другие генотипы ВПЧ ВКР — в 554(5,27%) образцах.

Таким образом, своевременное выявление предопухолевых изменений шейки матки является важной задачей современного здравоохранения. Проведение цитологического скрининга и ВПЧ — тестирования позволяет формировать группы риска развития РШМ. Снижение показателей заболеваемости РШМ зависит от широкого внедрения методов цитологического и молекулярно-генетического тестирования, что приведет к своевременному выявлению ранних форм злокачественных цервикальных новообразований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ВПЧ-ТЕСТИРОВАНИЯ У ЖЕНЩИН В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ ЗА ПЕРИОД 2017-2022 гг

Гапенко Е. В., Мавричев С. А., Стукалова И. В., Коваленко Д. Г.

РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

Актуальность. В настоящее время считается доказанным, что вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) является этиологической причиной в развитии рака шейки матки. Многочисленные мировые исследования продемонстрировали, что выполнение ВПЧ-тестирования в данном случае характеризуется высокой чувствительностью, а также положительной предиктивной ценностью. Это привело к тому, что диагностика этой инфекции стала рассматриваться как важнейший элемент в профилактике и ранней диагностике рака шейки матки.

Цель. Провести анализ результатов молекулярно-генетического исследования соскобов из шейки матки на наличие ДНК ВПЧ ВКР методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Материалы и методы. Объектом ВПЧ-тестирования послужил 10861 соскоб эпителиальных клеток шейки матки женщин в возрасте от 25 до 65 лет, проживающих на территории Республики Беларусь. ВПЧ-тестирование осуществлялось в онкологическом отделении (вирусологии) РНПЦ онкологии и медицинской радиологии имени Н. Н. Александрова за период 2017-2022 гг. Исследование проводилось методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме

реального времени с применением наборов реагентов «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» (ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ, Москва) и «Ампли Прайм ВПЧ ВКР 14» (ООО «НекстБио» РФ, Москва) с использованием оборудования CFX96™ («BioRad», США).

Результаты. Целью молекулярно-генетических исследований 10861 соскоба эпителиальных клеток шейки матки было обнаружение ДНК 14 типов ВПЧ ВКР. При проведении ПЦР-диагностики, ДНК ВПЧ ВКР была определена у 1278 (11,8%) человек. Дальнейшее обследование у гинеколога проведено 1081 женщине, из них у 227 (21%) была выявлена патология шейки матки. Из 227 человек, цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN) CIN I-III выявлена у 220 (96,9%), рак шейки матки был установлен у 7 (3,1%).

Выводы. Инфицированность вирусом папилломы в анализируемой группе из 10861 человек составила 11,8%. При этом среди лиц с обнаруженным ДНК ВПЧ ВКР у 21% была выявлена патология шейки матки. Полученные результаты подтверждают литературные данные о высокой эффективности применения молекулярно-генетической диагностики с использованием ПЦР в скрининговых программах по раннему выявлению предопухолевых заболеваний и рака шейки матки.

Раздел 3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ОНКОЛОГИИ

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ГЕНЕ ATM ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОМ РМЖ

Зиннатуллина Г.Ф.^{1,2}, Бермишева М.А.^{3,4}

¹ Клиническая больница №8 ФМБА, Обнинск, Россия

² Республиканский клинический онкологический диспансер, Уфа, Россия

³ Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН), Уфа, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Считается, что около 10% случаев рака молочной железы (РМЖ) являются наследственными, то есть возникают в результате генетических изменений (мутаций), переданных от родителей. Наиболее распространенной причиной наследственного РМЖ является наличие патогенных вариантов в генах *BRCA1* или *BRCA2*, которые кодируют белки, вовлеченные в процесс восстановления поврежденной ДНК. Мутированные версии этих генов могут привести к аномальному росту клеток и возникновению рака. Мутации в других генах также могут способствовать развитию наследственного РМЖ. Они встречаются гораздо реже, и большинство из них относятся к факторам умеренного риска развития РМЖ в отличие от генов *BRCA1/2*. Ген атаксии-телеангиэктазии (*ATM*), входит в число генов-предрасположенности к развитию РМЖ. *ATM* известен большим количеством вариантов неопределенного значения (VUS) и вероятно патогенных вариантов (PV) по сравнению с другими генами.

Ген *ATM* (11q22–23) представляет собой онкосупрессор. Он состоит из 66 экзонов, кодирует фермент протеинкиназу, которая играет важную роль в регуляции клеточного цикла и восстановлении повреждений ДНК, вызванных ионизирующим излучением. Воздействие ионизирующего излучения, даже в очень низких дозах, может вызвать расщепление значительного количества клеточных неактивных гомодимеров *ATM* до активных мономеров. Активированный *ATM* фосфорилирует ряд своих нижестоящих мишеней, таких как p53, chek2 и *BRCA1*, которые останавливают клеточный цикл, восстанавливают ДНК или стимулируют процесс апоптоза, поэтому мутация в любом из этих генов вызывает недостаточное восстановление клеток и в конечном итоге повышает риск развития злокачественного процесса. Биаллельные нарушения в гене *ATM* вызывают атаксию телеангиэктазию (АТ) — аутосомно-рецессивный синдром, при котором у пациентов наблюдаются такие симптомы, как чувствительность к ионизирующему излучению, иммунодегенерация мозжечка и высокий риск возникновения и развития рака. Отмечена высокая заболеваемость РМЖ в семьях с АТ. Кроме того, эпидемиологические исследования показали, что гетерозиготные носители мутации в гене *ATM* имеют в 2–5 раз выше риск возникновения РМЖ. Согласно литературным данным, в группе пациентов РМЖ, которые являются носителями патогенных вариантов в гене *ATM*, прошедших лучевую терапию, риск развития второго злокачественного процесса значительно выше, чем в груп-

пе пациентов, получивших лучевую терапию и не являющихся носителями мутаций в гене *ATM*.

Цель. Наше исследование направлено на изучение генетической структуры РМЖ в разных популяциях РФ.

Материалы и методы. Проведено NGS секвенирование таргетной панели генов, ассоциированных с онкологическими заболеваниями, на образцах ДНК, выделенных из лейкоцитов периферической крови пациентов с РМЖ. Группа исследования была сформирована с учетом отягощенного семейного анамнеза РМЖ / РЯ на базе Клинического онкологического диспансера Министерства Здравоохранения Республики Башкортостан (г. Уфа) в 2020–2021 гг.

Результаты. Определен редкий герминальный вариант NM_000051.4(*ATM*):c.6658C>T. Замена c.6658C>T в гене *ATM* приводит к формированию преждевременного стоп-кодона p.Gln2220Ter и синтезу укороченного белка, вследствие чего происходит потеря функции фермента. Согласно базы данных ClinVar вариант *ATM** c.6658C>T является клинически патогенным (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000470482>).

У пациентки с РМЖ — носительницы вышеуказанной мутации диагноз люминальный В тип HER2-позитивный РМЖ установлен в возрасте 73 лет. Из представленного ею семейного анамнеза, у двух сестер пациентки установлен диагноз РМЖ, у отца — рак желудка, у сына — рак мочевого пузыря. Определение патогенных вариантов в гене *ATM* у больных РМЖ не является уникальным событием, но мутации в этом гене встречаются реже чем в гене *BRCA1*. Так, в нашей выборке больных РМЖ (n=1000) была выявлена другая нонсенс мутация c.5932G>T (p.Glu1978Ter) в гене *ATM* у двух пациенток с РМЖ в возрасте 34 и 58 лет. У племянницы одной из пациенток также исследован биоматериал, выявлена мутация с заменой *ATM**c.5932G>T и диагностирован трижды негативный РМЖ.

Обсуждение. Почему в настоящее время важен анализ гена *ATM* при онкологических заболеваниях? Установлено, что гетерозиготные мутации гена *ATM* ассоциированы не только с РМЖ, но и с другими онкологическими заболеваниями (рак поджелудочной железы, аденокарцинома легких, рак толстой кишки). В настоящее время хорошо известно, что опухоли с мутациями в генах, кодирующих белки, участвующие в репарации ДНК, более чувствительны к лечению, которое вызывает цитотоксичность, вызывая повреждение ДНК или ингибируя механизмы репарации ДНК. Поскольку опухоли с мутацией *BRCA1*

могут быть более чувствительны к лечению производными платины и получать пользу от лечения ингибиторами *PARP*, аналогичные стратегии можно также предположить для пациентов с РМЖ, несущих мутации гена *ATM*. Более того, признано, что радиочувствительность является отличительной чертой синдрома АТ. Как следствие, гетерозиготные мутации в гене *ATM* повышают токсичность лучевой терапии, вероятно, из-за дефектной репарации ДНК и нестабильности генома в нормальных тканях. Учитывая эти данные, побочные эффекты, возникающие у пациентов с РМЖ во время химиотерапии, могут увеличиваться у пациентов с патогенными вариантами в гене *ATM*. Показано,

что генетические варианты *ATM* играют клинически значимую роль в радиационно-индуцированном контралатеральном раке молочной железы.

В заключении отметим, что исследования в области молекулярной эпидемиологии ЗНО важны не только в области профилактики и диагностики, но также при выборе тактики лечения.

Работа выполнена в рамках ГЗ Минобрнауки РФ (№122041400169-2), при поддержке СПбГУ (грант 94034528), Программы развития биоресурсных коллекций №007-030164/2, мегагранта Правительства РФ № 2020220082197.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СПЕКТР ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК КАК МАРКЕР ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ ОПУХОЛЕЙ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ: ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ NCT04817501

Кайгородова Е.В.^{1,2}, Грищенко М.Ю.^{2,3}

¹ «Научно-исследовательский институт онкологии» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» — НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск, Россия

² ФГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

³ Областное государственное автономное учреждение здравоохранения «Томский областной онкологический диспансер», г. Томск, Россия

Введение. В структуре онкологической заболеваемости женщин наибольший удельный вес имеют злокачественные новообразования органов репродуктивной системы (39,1%). Ведущей онкологической патологией является рак молочной железы (21%), опухоли половых органов составляют 18,1% всех злокачественных новообразований у женщин, при этом рак эндометрия встречается в 7,7%, а рак яичников в 4,3% [1]. Метастазирование злокачественных опухолей — одна из основных причин смертельных исходов. Ведущую роль в возникновении метастазов и рецидивов опухоли занимают циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК). В процессах рецидивирования и метастазирования участвуют циркулирующие опухолевые клетки. Известно, что популяция ЦОК гетерогенна [2–5]. Показано, что даже локализованные опухоли без клинически видимых метастазов являются источниками ЦОК [3, 7, 8].

Цель исследования: оценить фенотипический спектр ЦОК по маркерам стволовости, EMT (epithelial-mesenchymal transition), уровня пролиферативной активности *ki67*, *Her2*, а также атипичных/гибридных форм клеток с фенотипом *Ercam+CD45+* у больных раком молочной железы, раком эндометрия и раком яичников и их связь с риском возникновения рецидивов и метастазов.

Материалы и методы. В Томском НИМЦ совместно с Томским областным онкологическим диспансером проводится клиническое исследование NCT04817501 «Фенотипический спектр циркулирующих опухолевых клеток при

опухолях женской репродуктивной системы». В проспективное исследование вошли 155 больных РМЖ T1-4N0-3M0 стадии, 55 больных раком эндометрия T1-4N0-3M0 и 50 больных раком яичников Ic–IIc стадии по системе FIGO. Материалом для исследования служила венозная кровь стабилизированная ЭДТА. Оценку наличия и молекулярного профиля ЦОК проводили методом многоцветной проточной цитометрии.

Результаты исследования. В результате проведенного исследования был разработан способ дооперационного прогнозирования риска рецидива у больных раком эндометрия T1 стадии (Патент №2762493 от 21.12.2021), способ прогнозирования гематогенного метастазирования при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы на основе определения циркулирующих опухолевых клеток в крови до лечения (Патент на изобретение RU2678202 C1, 24.01.2019). Способ прогнозирования риска опухолевой прогрессии у больных раком яичников (справка о приоритете 2023120150 от 31.07.2023). В основу прогностической модели легли данные многоцветной проточной цитометрии о количестве различных популяций ЦОК, включая стволовые ЦОК (с фенотипом *Ercam+CD45-CD44+CD24-Ncadherin+*, стволовые ЦОК с отрицательной экспрессией *Ercam* на мембране *Ercam(m)-CD45-CD44+CD24-* и *Ercam(m)-CD45-CD44+CD24-Ncadherin+*, ЦОК с признаком EMT (epithelial-mesenchymal transition) с фенотипом *Ercam+CD45-CD44-CD24-Ncadherin+* и атипичные/гибридные популяции клеток с фенотипом *Ercam+CD45+*. Следует отметить, что у больных с развив-

шимися гематогенными метастазами чаще всего наблюдались ЦОК положительные по маркеру Her2.

Заключение. Таким образом, полученные результаты показывают практическую пользу многоцветной проточной цитометрии в жидкостной биопсии онкологических заболеваний. Возможность оценки ЦОК по различным молекулярным параметрам может быть полезным для диагностики, прогноза, мониторинга и определения стратегии лечения больных раком. Для стратификации пациентов используются количественные результаты проточной цитометрии, а не только качественное разделение больных на ЦОК-позитивных и ЦОК-негативных.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ МД-2017.2020.7.

Литература

1. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О., ред. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность) — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, — 2022. — илл. — 252 с

2. Kaigorodova E.V. Circulating tumor cells: clinical significance in breast cancer (Review). *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2017;72(6):450-457. (In Russ.) DOI:10.15690/vramn833

3. Kaigorodova E.V., Tarabanovskaya N.A., Staheeva M.N., Saveliyeva O.E., Tashireva L. A., Denisov E. V., Perelmuter V. M. Effect of minor and major surgical injury on the level of different populations of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients. *Neoplasma*. 2017;64(3):437-443.

doi: 10.4149/neo_2017_315

4. Pauken CM, Kenney SR, Brayer KJ, Guo Y, Brown-Glaberman UA, Marchetti D. Heterogeneity of Circulating Tumor Cell Neoplastic Subpopulations Outlined by Single-Cell Transcriptomics. *Cancers*. 2021; 13(19):4885. <https://doi.org/10.3390/cancers13194885>

5. Kaigorodova E.V., Kozik A.V., Zavaruev I.S. Grishchenko M.Y. Hybrid/Atypical Forms of Circulating Tumor Cells: Current State of the Art. *Biochemistry Moscow*. 2022; 87: 380–390 DOI: 10.1134/S0006297922040071

6. Кайгородова Е.В., Тарабановская Н.А., Суркова П.В., Зельчан Р.В., Гарбуков Е.Ю. Наличие в крови различных популяций циркулирующих опухолевых клеток у больных раком молочной железы до лечения: связь с пятилетней безметастатической выживаемостью. *Сибирский онкологический журнал*. 2020; 19(6):57-65. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-6-57-65> Kaigorodova E.V., Tarabanovskaya N.A., Surkova P.V., Zelchan R.V., Garbukov E.Yu. The presence of various populations of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients before treatment: association with five-year metastasis-free survival. *Siberian journal of oncology*. 2020; 19(6):57-65. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-6-57-65>

7. Yang M.H., Imrali A., Heeschen C. Circulating cancer stem cells: the importance to select. *Chin J Cancer Res*. 2015 Oct;27(5):437-49. doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2015.04.08.

8. Liang D.H., Hall C., Lucci A. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2020;215:127-145. doi: 10.1007/978-3-030-26439-0_7. PMID: 31605227.

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ЭКЗОСОМАЛЬНЫХ МИКРОРНК У ПАЦИЕНТОВ СО СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМОЙ

Иванова Е.А.^{1,2}, Асадуллина Д.Д.¹, Гилязова Г.Р.³, Измайлов А.А.³, Павлов В.Н.³, Хуснутдинова Э.К.¹, Гилязова И.Р.^{1,3}

¹ Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, (ИБГ УФИЦ РАН) Уфа, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

Введение. Рак почки (РП) — это гетерогенная группа злокачественных опухолей, подавляющее большинство которых представляют собой почечно-клеточные карциномы (ПКК) различных морфологических типов. Несмотря на интенсивные исследования процессов канцерогенеза и бурно развивающееся фармакологическое направление по разработке противоопухолевых таргетных препаратов, рак почки занимает третье место среди опухолей мочеполовой системы по частоте встречаемости, а по смертности находится на первом. Возможность использования жидких

биопсий (на основе циркулирующих в крови внеклеточных нуклеиновых кислот) в исследовании злокачественных опухолей должна снять вопрос доступности биоматериалов, представляя собой, таким образом, важное достижение в области персонализированной медицины. Свободно циркулирующие нуклеиновые кислоты (НК) могут попадать в кровотоки в результате пассивного высвобождения тканью или повреждения клеток, либо активно секретироваться в виде внеклеточных циркулирующих НК, связанных с липопротеинами или переносимых экзосомами. При этом,

микроРНК считаются одними из ключевых участников патогенеза онкологических заболеваний. Изменение профиля экспрессии микроРНК обнаружены при развитии всех злокачественных опухолей, причем микроРНК могут выступать как в роли онкогенов, так и опухолевых супрессоров. Введение простого, неинвазивного, достаточно чувствительного и специфического метода, основанного на анализе микроРНК, позволило бы осуществлять раннюю диагностику и прогнозировать течение заболевания, а также оценивать эффективность применяемой терапии, что является на сегодняшний день актуальной задачей.

Материалы и методы. В ходе исследования проведен анализ экспрессии 188 экзосомальных микроРНК выделенных из плазмы крови 20 пациентов со светлоклеточной почечно-клеточной карциномой и 20 здоровых индивидов из контрольной группы. От каждого участника исследования получено информированное согласие. Экзосомы выделяли из плазмы крови, полученной двукратным центрифугированием при 4°C (10 мин при 1900 г и 15 мин при 3000 г). Экзосомальную микроРНК выделяли из 1 мл фильтрованной плазмы крови с помощью набора exoRNeasy Midi Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Анализ экспрессии проводили с использованием панелей TaqMan™ Advanced miRNA Human Serum/Plasma 96-well Plates (ThermoFisher Scientific, Массачусетс, США) и анализатора в реальном времени LightCycler® 96 (Roche, Базель, Швейцария). Этапы анализа экспрессии включали синтез кДНК с использованием набора TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, Массачусетс, США) с предварительной поли(А) хвостовой реакцией, лигированием адаптора и реакцией преамплификации. Постановка ПЦР в реальном времени осуществлялась с использованием мастер микса TaqMan® Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Анализ уровней экспрессии проводился с использованием программ-

ного обеспечения прибора LightCycler® 96 (Roche, Базель, Швейцария), оценка статистических различий проводилась с использованием программ Microsoft Excel и GraphPad Prism 6.7 (v.6.7, GraphPad Software (Dotmatics), Сан-Диего, Калифорния, США). Для количественной оценки уровня экспрессии микроРНК использован метод относительных определений количественных значений $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$. Оценка различий уровней экспрессии проводилась с использованием метода ANOVA (тест Крускала-Уоллеса с последующим тестом Данна на множественное сравнение). Различия в группах со значением p-value менее 0,05 считались статистически значимыми.

Результаты. В результате профилирования экспрессии экзосомальных микроРНК плазмы крови было показано статистически значимое повышение уровней экспрессии микроРНК-106a-5p, -122-5p, -144-5p и -17-5p у пациентов со скПМК по сравнению со здоровым контролем. Напротив, экзосомальные микроРНК let-7d-5p, -146a, -191-5p, -20a-5p, -20b-5p, -23b-3p, 485-3p, -652-3p и -92a-3p демонстрировали снижение уровней экспрессии у пациентов со скПМК по сравнению с индивидами без онкопатологии.

Заключение. На данном этапе исследования получен профиль экспрессии микроРНК, демонстрирующих достоверные различия между индивидами со скПМК и здоровым контролем. Далее полученные результаты будут валидированы на независимой выборке, а также проведена оценка взаимосвязи уровней экспрессии экзосомальных микроРНК плазмы крови с клинико-патологическими характеристиками опухоли.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-75-00087, <https://rscf.ru/project/22-75-00087/> (выделение микроРНК и анализ экспрессии микроРНК) и Санкт-Петербургского государственного университета (ID PURE: 94034528) (сбор биоматериала).

ДЛИННЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК MEG3, ZEB1-AS СВЯЗАНЫ С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ РАКА ЯИЧНИКОВ

Лукина С.С.¹, Бурдённый А.М.¹, Пронина И.В.¹, Филиппова Е.А.¹, Казубская Т.П.², Кушлинский Н.Е.², Логинов В.И.¹, Брага Э.А.¹.

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». Москва, Российская Федерация.

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация.

Рак яичников (РЯ) протекает бессимптомно и по-прежнему остается одним из видов рака женской репродуктивной системы с самым неблагоприятным прогнозом во всем мире. Этот вид онкологии характеризуется своим активным метастазированием, включающим лимфогенное, отдаленное и имплантационное метастазирование. Известно, что длинные некодирующие РНК (днРНК) контролируют каждый уровень экспрессии генов, влияя на патофизиологические процессы, связанные с онкогенезом, в частности, на эпителиально-мезенхимальный пере-

ход (ЭМП). Этот процесс в онкологической клетке связан с развитием метастазов, обеспечивая распространение раковых клеток за счёт усиления миграции и инвазии. Таким образом, понимание анатомии регуляторных механизмов, в которые вовлечены длинные днРНК при метастазировании РЯ, является значимым и перспективным направлением исследований.

Целью нашего исследования является оценка связи изменения уровня экспрессии и метилирования генов днРНК MEG3, ZEB1-AS с метастазированием РЯ.

Анализ уровня метилирования и экспрессии проводился с применением метилспецифичной ПЦР и q-PCR в реальном времени на выборке не менее 30 парных (опухоль/норма) образцов больных РЯ, а также перитонеальных макрометастазов от этих пациенток. Статистический анализ уровней метилирования и экспрессии выполнен с применением непараметрического U-теста Манна-Уитни в программной среде R 4.2.1 (RStudio). Для всех статистических тестов значимыми считали значения $p \leq 0.05$.

Анализ уровня метилирования показал, что в образцах опухоли в сравнении с парной условной нормой для генов днРНК MEG3, ZEB1-AS уровень метилирования статистически значимо выше ($p < 0.01$, FDR=0.1). При этом уровень экспрессии этих днРНК в опухолевой ткани статистически значимо снижался ($p < 0.01$, FDR=0.1). Выявленный эффект позволяет предположить супрессорный характер данных днРНК. Этот эффект сохранялся и при анализе уровней метилирования и экспрессии на разных этапах

развития опухоли. Обнаружено статистически значимое ($p \leq 0.05$, FDR=0.1) повышение уровня метилирования этих генов при анализе стадии, размера и степени дифференцировки опухоли.

Важной особенностью для генов днРНК MEG3, ZEB1-AS явилось статистически значимое ($p < 0.05$, FDR=0.1) снижение уровня метилирования в макрометастазах брюшины относительно исходной опухоли. Выявленная особенность может косвенно указывать на процесс пластической реверсии, вызванной ЭМП в первичной опухоли, и обратного мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП) при формировании и колонизации метастазов.

На основании полученных результатов и дополнительного исследования на большей выборке возможно использование этих днРНК в качестве прогностического маркера метастазирования РЯ.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ №20-15-00368-П.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДИАГНОСТИКИ, ОЦЕНКИ ПРОГНОЗА И ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Кветной И.М.^{1,6}, Зубарева Т.С.^{1,2}, Миронова Е.С.^{1,2}, Крылова Ю.С.^{1,3}, Дохов М.А.^{1,4}, Зубарева А.С.^{1,2}, Пальцева Е.М.⁵

¹ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

² АНО НИЦ «Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Российская академия наук (РАН), Москва, Россия

⁶ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Молекулярные исследования, проведенные в последние годы, показали участие сигнальных молекул, продуцируемых микроокружением предстательной железы, желудка, тимуса и других органов (особенно фибробластами) в механизмах развития гиперпластических процессов, в том числе и злокачественных новообразований. Установлено, что нарушение экспрессии сигнальных молекул фибробластами влечет за собой запуск программы локального клеточного старения и способствует более ускоренному развитию органных гиперпластических процессов. Значение фибробластов, как клеток микроокружения, в механизмах органного старения и ассоциированной с этим опухолевой патологии, еще более подтверждается результатами исследований по совместному культивированию фибробластов и эпителиальных клеток предстательной железы. Так, было показано, что если в совместную культуру фибробластов и эпителиальных клеток простаты добавить фибробласты, которые ранее пассировались совместно с опухолевыми клетками простаты, то после их добавления в эпителиальных клетках первой культуры так же возникают неопластические изменения. Подобные обстоятельства, в свою очередь, открывают перспективы прикладного характера новые пути

для разработки новых маркеров с целью оптимизации диагностики, оценки прогноза и эффективности лечения опухолевых заболеваний.

Цель исследования. Изучить экспрессию и оценить онкопрогностическую значимость транскрипционных протеинов Pax1, Noxa3, TLP, CXCL12, WEDC1 и RUNX3 в злокачественных опухолях желудка, предстательной железы, почек и яичников человека.

Материал и методы. Экспрессию протеинов Pax1, Noxa3, TLP, CXCL12, WEDC1 и RUNX3 в биоптатах и операционном материале опухолей желудка, предстательной железы, почек и яичников человека изучали в условиях *in vivo* (клинический материал) и *in vitro* (культивирование штаммов опухолевых клеток) методом иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии с использованием микроскопа Leica TCS SP5 и системы MRC-1024, укомплектованной программой компьютерной обработки конфокальных микроскопических изображений для построения трехмерных изображений LaserSharp 5.0 (Bio-Rad).

Результаты. Установлено изменение динамики экспрессии протеинов Pax1, Noxa3, TLP, CXCL12, WEDC1 и RUNX3 в злокачественных опухолях изученных органов по сравнению с нормальной тканью. Показано, что степень

экспрессии всех изученных протеинов достоверно снижается с усилением прогрессии опухолевых клеток, пролиферативной активностью, степенью инвазии и широты метастазирования. При этом для рака желудка наибольшую информативность несет протеин Ноха3, для рака простаты — протеины WEDC1 и RUNX3, для рака почки — протеины Рах1 и TLP, для рака яичников — протеины CXCL12 и RUNX3.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о важной роли транскрипционных протеинов, вырабатываемых клетками микроокружения опухолей в механизмах опухолевой прогрессии, а также позволяют считать определение экспрессии указанных маркеров информативным и полезным при патоморфологической диагностике злокачественных опухолей человека.

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ МАРКЕРЫ В ПРОГНОЗЕ РАЗВИТИЯ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИМ ЛАРИНГИТОМ

Какурина Г.В.^{1,2}, Середа Е.Е.^{1,2}, Черемисина О.В.¹, Кондакова И.В.¹, Чойнзонов Е.Ц.^{1,2}

¹ НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия

² ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

Актуальность. Диагностическая доступность для визуализации органов головы и шеи не решает проблему ранней диагностики плоскоклеточного рака гортани и гортаноглотки (РГ). Рак этой локализации считается одним из самых агрессивных типов опухолей и позднее его выявление негативно отражается на выживаемости больных РГ [1]. Хронический гиперпластический ларингит с высокой степенью поражения эпителия (ХГЛ(High grade)) является одной из предопухолевых патологий и в 60% случаев малигнизируется [1]. Процесс опухолевой трансформации тесно связан с ремоделированием цитоскелета, и в том числе с белками участвующими в его регуляции [2, 3, 4]. Поэтому актуально оценить возможность использования молекулярных характеристик изменений цитоскелета для разработки новых маркеров диагностики и прогноза РГ.

Цель и задачи исследования. Оценить возможность использования содержания сывороточных белков цитоскелета таких, как аденилилциклаза-ассоциированный протеин 1 (CAP1), кофилин 1 (CFN1), эзрин (EZR), фасцин (FSCN1), профилин 1 (PFN1) и фермент протеинфосфатазы 1В в качестве ранних маркеров опухолевого процесса. С этой целью провели сравнительный анализ выбранных мише-

ней в группах больных РГ и пациентов с ХГЛ (high grade).

Материал и методы исследования. Содержание изучаемых белков исследовали в сыворотке крови 46 больных РГ (Т1-4N0M0), 15 здоровых лиц и 18 пациентов с ХГЛ (high grade) на микропланшетном ИФА ридере Anthos Reader 2020 (Biochrom) методом ELISA, с применением коммерческих наборов. Все вошедшие в исследование пациенты не получали специального противоопухолевого лечения перед набором материала для исследования. Результаты, представленные в таблицах, выражены как содержание белка (нг) в 1 мл сыворотки крови. Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. Результаты, представлены в таблицах как Me (Q1;Q3), где Me — медиана, Q1 и Q3 — нижний и верхний квартили, P (U-test) — уровень значимости различий между двумя независимыми выборками.

Результаты исследования. В группе больных с РГ уровень CFL1, FSCN1 и CAP1 был выше в 2,6, в 4,7 и в 12 раз, соответственно, чем в группе пациентов с ХГЛ (high grade) (табл.1, P2). В группах больных РГ с начальной стадией опухолевого процесса и запущенной стадией (P1) значимые различия наблюдались в уровнях FSCN1, CAP1 и PPM1B.

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ БЕЛКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТА, В СЫВОРОТКЕ КРОВИ В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ РГ И ПАЦИЕНТОВ С ХГЛ(HIGH GRATE)

показатель	ХГЛ(high grate)	Т1-2N0-1M0	Т3-4N0-2M0	P (U-test)	
				P1	P2
CFL1	0,29(0,23;0,45)	0,76(0,61;1,14)	0,76(0,54;0,93)	0,70	0,00
FSCN1	0,34(0,15;0,84)	1,59(0,50;6,05)	4,82(0,43;8,10)	0,05	0,03
CAP1	0,07(0,04;0,09)	0,87(0,67;1,24)	1,20(0,78;1,64)	0,00	0,00
EZR	1,45(1,17;1,95)	1,93(1,54;2,44)	2,00(1,54;2,50)	0,21	0,11
PFN1	0,24(0,20;0,29)	0,27(0,23;0,37)	0,28(0,23;0,38)	0,32	0,12
PPM1B	0,31(0,15;0,47)	0,67(0,33;0,77)	0,78(0,63;1,38)	0,05	0,02

Примечание: P1– значимость различий в группах «Т1-2N0-1M0» и «Т3-4N0-2M0», P2 — значимость различий в группах «ХГЛ(high grate)» и «Т1-2N0-1M0»

Методом дискриминантного анализа была разработана модель прогнозирования развития РГ:

$$Y1 = -87,5 + 69,2 * X1 - 515 * X2 + 232 * X3 + 6,4 * X4 + 24,4 * X5 - 7,34 * X6$$

$$Y2 = -286,5 + 118,6 * X1 + 918,2 * X2 + 39,3 * X3 + 12,3 * X4 + 65,9 * X5 - 9,3 * X6$$

Где X1 — содержание CFL1, нг/мл; X2 — содержание PFN1, нг/мл; X3 — содержание EZR, нг/мл; X4 — содержание FSCN1, нг/мл; X5 — содержание CAP1, нг/мл; X6 — содержание протеинфосфатазы 1B (PPM1B) нг/мл;

Y1 — низкая вероятность развития плоскоклеточно-го рака, Y2 — высокая вероятность.

Если значение функции $Y1 > Y2$, то прогнозируют высокую вероятность развития плоскоклеточного рака у больных ХГЛ с морфологически подтвержденной дисплазией слизистой оболочки (high grade).

Чувствительность и специфичность модели составили 76% и 78%, соответственно, $p = 0,04$.

Выводы. Результаты, полученные на представленных выборках больных РГ и пациентов с ХГЛ, говорят о связи содержания белков цитоскелета в сыворотке крови со стадией заболевания и развитием злокачественной опухоли на фоне диспластических процессов в эпителии верхних дыхательных путей. По-

лученная модель может быть использована в качестве дополнительных диагностических методик для раннего выявления РГ. Определение сывороточных маркеров является экономически выгодным и менее инвазивным методом диагностики опухолевых заболеваний, особенно на этапах скрининговых исследований.

Список литературы:

1. Хронический гиперпластический ларингит как критерий формирования группы риска по раку гортани. Черемисина О. В., Чойнзонов Е.Л., Панкова О.В., Меньшиков К.Ю. // Российская оториноларингология. 2013. № 2 (63). С. 84-89.

2. Характеристика протеома биологических жидкостей при плоскоклеточных карциномах головы и шеи / Г. В. Какурина, И. В. Кондакова, Е. Л. Чойнзонов // Молекулярная медицина. 2013. № 2. С. 33-37. EDN PZAGKX.

3. Cytoskeletal Remodeling in Cancer. Aseervatham J./Biology, 2020, 9(11), 385. <https://doi.org/10.3390/biology9110385>

4. Serum levels of cytoskeleton remodeling proteins and their mRNA expression in tumor tissue of metastatic laryngeal and hypopharyngeal cancers / G. V. Kakurina, O. V. Cheremisina, E. E. Sereda [et al.] // Molecular Biology Reports. 2021. Vol. 48, No. 6. P. 5135-5142.

ПОКАЗАТЕЛИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И АКТИВАЦИИ ПОПУЛЯЦИИ Т-КЛЕТОК С РЕГУЛЯТОРНЫМ ФЕНОТИПОМ И МАРКЕРАМИ АПОПТОЗА, ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК PD1, PDL1, TIM3, LAG3 В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТАХ И ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТАХ У ПАЦИЕНТОВ С ПРЕИНВАЗИВНЫМ И МИКРОИНВАЗИВНЫХ РШМ

Ковчур П.И., Курмышкина О.В., Ковчур О.И., Волкова Т.О.

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск

Цель работы: оценить роль различных популяций иммунных клеток в создании условий для перехода цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН 3) в микроинвазивный инвазивный рак (мРШМ) на системном и локальном уровне. Сравнить анализ паттерна коэкспрессии иммунных контрольных точек (ИКТ): PD1 (CD279), PDL1 (CD274/B7-H1), TIM3 (CD366) и LAG3 (CD223) в основных популяциях Т-лимфоцитов, выделенных из образцов опухолевой ткани и периферической крови пациенток с преинвазивным и микроинвазивным раком шейки матки (РШМ).

Материал и методы: Проведен анализ изменений частоты CD4⁺/CD8⁺ периферической крови, T-reg, NKregs параллельно с оценкой концентрации TGFβ в сыворотке, экспрессии CD95 и уровня апоптоза в Т-клетках у 37 с ЦИН 3 и 30 — мРШМ (IA₁) с вирусом папилломы человека (ВПЧ) в 100%. Контроль — 30 здоровых женщин без патологии ш/матки и ВПЧ. Анализ экспрессии ИКТ проводился методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (BioLegend, Miltenyi Biotec) и комбинации

флуорофоров. Для иммунофенотипирования опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) образцы ткани подвергались ферментативной диссоциации с получением суспензии одиночных клеток. Результат выражается в процентах, характеризующих наличие в крови клеток, типизируемых по маркерам PD1 и TIM3, либо PD1 и LAG3 в общей популяции CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Результаты и обсуждение. Определили общее количество CD25⁺, FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25^{high} и CD4⁺FoxP3⁺ лимфоцитов. Популяцию Treg CD4 определили путем анализа двух комбинаций Treg-маркеров: CD4⁺CD25⁺/high CD127^{low} — и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. У пациентов с ЦИН3 и IA₁ отмечена высокая частота CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25^{high} лимфоцитов и увеличение CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ клеток среди CD4-положительных лимфоцитов ($p < 0.01$). Соотношение CD8⁺ Т-клеток к CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ в периферической крови больных было снижено. Численность CD8⁺CD25⁺ лимфоцитов в образцах крови больных ЦИН3 и РШМ IA₁ выше, чем в контроле. Частота CD25⁺FoxP3⁺

клеток в популяции CD8⁺ лимфоцитов увеличивалось при ЦИН3 и РШМ IA₁, в сравнении с контролем ($p < 0.05$), как и доля CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD8⁺CD25⁺CD127^{low/neg} клеток в общей популяции лимфоцитов крови больных. Кроме увеличения количества лимфоцитов с Treg-фенотипом в крови больных пре-/микроинвазивным раком, выявлено повышение концентрации белка TGFβ1 ($p < 0.01$). Выявлено увеличение численности в периферической крови CD95⁺T клеток за счет CD4⁺CD95⁺ ($p < 0.05$) и снижение (%) CD8⁺CD95⁺ клеток ($p > 0.05$) при формировании инвазивного рака. Численность Т-лимфоцитов, связывающих Annexin V, было выше в группе больных ЦИН3/IA ($p < 0.01$). Таким образом, развитие мРШМ ассоциировано с увеличением экспрессии CD95 Т-лимфоцита и активизацией апоптотических процессов в CD95⁺ Т-клетках, что согласуется с результатами нашего ранее исследования, где выявлено повышение активности ключевых CD95-ассоциированных каспаз -8 и -3 в суммарной фракции мононуклеаров периферической крови у больных с ЦИН3 и РШМ IA₁.

Функциональное состояние лимфоцитов обусловлено уровнем совместной экспрессии ИКТ — PD1/PDL1, TIM3 и LAG3, принадлежностью к определенной субпопуляции Т-клеток, локализации Т-клеток. При сравнении уровня экспрессии (в % окрашенных клеток) PD1 и PDL1 в общих популяциях CD4 и CD8 лимфоцитов периферической крови (ЛПК) значимо в группе больных, и более выражено для

CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов. Так, при ЦИН3 количество клеток с фенотипом CD3⁺CD8⁺PD1⁺TIM3⁺ и CD3⁺CD8⁺PD1⁺LAG3⁺ в каждом из вариантов не превышал 5% от общей популяции CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов. Напротив, при мРШМ количество таких клеток в каждом из указанных случаев более 5%. При рассмотрении популяций CD4 и CD8 Т-клеток в образцах пре- и микроинвазивного РШМ характерен более высокий процент клеток, экспрессирующих PD1/PDL1, TIM3 и LAG3, что указывает на состояние иммунного истощения. С другой стороны, подавляющая доля ОИЛ были положительны по CD25. Выявлено увеличение активированных Treg в ОИЛ и увеличение CD8⁺FOXP3⁺CD25⁺ Т-клеток, экспрессирующих PD1⁺ и TIM3⁺. Аналогичная тенденция наблюдалась для CD25⁺CD127^{low/neg} Т-клеток.

Выводы. Переход от преинвазивного к микроинвазивному РШМ сопровождается множественными иммунологическими изменениями на системном и локальном уровнях. На локальном уровне характерно увеличение уровня совместной экспрессии иммунных контрольных точек на ОИЛ и одновременно высокий уровень Т-клеток с Treg-фенотипом. При этом увеличение численности Treg в периферической крови параллельны изменениям в составе опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. Данный факт ограничивает противоопухолевый иммунный ответ и создает условия для прогрессии местно-распространенных и метастатических форм рака шейки матки.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НА СИСТЕМНОМ И ЛОКАЛЬНОМ УРОВНЯХ В ПРОЦЕССЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ, ПРЕИНВАЗИВНОГО И МИКРОИНВАЗИВНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Ковчур П.И.^{1,2}, Курмышкина О.В.¹, Ковчур О.И.¹, Хидишан И.В.², Волкова Т.О.

¹ ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

² ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», Петрозаводск

Своевременная диагностика и комплексное лечение цервикальной неоплазии (CIN1-2, CIN2, CIN3), преинвазивного (сr in situ) и микроинвазивного рака шейки матки (IA₁, РШМ) есть реальная вторичная профилактика рака шейки матки (РШМ).

Цель. Оценить влияние иммунотерапии при лечении CIN1-2, CIN2, CIN3/cr in situ и IA₁ РШМ с оценкой молекулярно-иммунологических показателей, выделенных из образцов опухолевой ткани и периферической крови пациента.

Материал и методы. Обследованы пациенты 3 групп. 1 группа (n=145) — пациентки с осложненным эктропионом, кондиломатозом и лейкоплакиями шейки матки, где выделили 2 подгруппы: а) с вирусом папилломы человека (ВПЧ) (n=63) и б) без ВПЧ (n=82). 2 группа (n=32) — пациентки с CIN1-2, CIN2 степени с ВПЧ в 90,6% (29) случаев. 3 группа (n=120) — с CIN3 (n=75) и IA₁ (n=45) РШМ (ВПЧ в 90,4% и 96,7% случаев соответственно). Контроль — 30 здоровых

женщин без патологии ш/матки и ВПЧ. Всем пациентам с ВПЧ в 3-х группах 1 этапом проводилось хирургическое лечение, 2 этапом — курс Гистидил-глицил-валил-серил-глицил-гистидил-глицил-глутаминил-гистидил-глицил-валил-гистидил-глицин («Аллокина-альфа») по 1,0 мг 6 раз через день, подкожно. Для иммунофенотипирования опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) образцы ткани подвергались ферментативной диссоциации с последующей проточной цитофлуориметрией клеточной суспензии и оценки экспрессии ключевых маркеров лимфоангиогенеза (ЛА) и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП): VEGFR3/FLT4, c-Met/HGFR, транскрипционных факторов мезенхимального фенотипа (SLUG и EpCAM).

Результаты и обсуждение. В периферической крови у пациентов с CIN3 и IA₁ РШМ выявлено увеличение CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ клеток среди CD4⁺ и CD25⁺FoxP3⁺ лимфоцитов, CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺, CD8⁺CD25⁺CD127^{low/neg} клеток, увеличение белка TGFβ1

($p < 0,01$), увеличение $CD4^+CD95^+$ ($p < 0,05$) и снижение (%) $CD8^+CD95^+$ клеток ($p > 0,05$) при формировании микроинвазивного РШМ. При сравнении уровня экспрессии (в % окрашенных клеток) PD1 и PDL1 в общих популяциях $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов периферической крови (ЛПК) значимо в группе больных, и более выражено для $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов. При CIN3 количество клеток с фенотипом $CD3^+CD8^+PD1^+TIM3^+$ и $CD3^+CD8^+PD1^+LAG3^+$ в каждом из вариантов не превышает 5% от общей популяции $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов. Напротив, при IA_1 РШМ количество таких клеток более 5% ($p < 0,05$). В составе иммунного микроокружения (на локальном уровне) изучена популяция $CD4^+$ и $CD8^+$ ОИЛ, для которых оценивался паттерн PD-1/-L1, TIM3, LAG3. Показано увеличение клеток, экспрессирующих PD1/PDL1, TIM3 и LAG3 ($p < 0,01$) и увеличение активированных $CD8^+FOXP3^+CD25^+$ Т-клеток, экспрессирующих $PD1^+$ и $TIM3^+$ и $CD25^+CD127^{low/neg}$ Т-клеток. Для неиммунного компонента микроокружения изучен паттерн коэкспрессии спектра генов, контролирурующих ключевые точки сигнальных путей ЛА и ЭМП — рецепторы VEGFR3, c-Met, транскрипционные факторы мезенхимального фенотипа SLUG и EpCAM.

Полученные результаты позволили нам обсуждать перспективные варианты иммунотерапии в комплексном лечении CIN3 и IA_1 РШМ.

В группе осложненной патологии шейки матки, CIN 1-2, CIN 2. В 1 группе ($n=145$) у женщин в подгруппе с ВПЧ ($n=63$) — эффективность лечения составила 96,8% (61) случаев через 3 месяца после комплексного лечения (ла-

зерная деструкция + Аллокин-альфа). В 3,2% отмечена неполная эпителизация и йод-негативные зоны и ВПЧ в клинически малозначимых концентрациях вируса ($< 2lg 105$). В подгруппе без ВПЧ ($n=82$) — эффективность только лазеролечения без иммунотерапии составила 85,4% (14,6% — неполная эпителизация и ВПЧ в клинически малозначимых концентрациях вируса). В 2 группе ($n=32$) у пациенток с CIN1-2, CIN 2 степени + ВПЧ ($n=29$) после комплексного лечения эффективность составила 93,1%.

В группах с CIN3 и IA_1 РШМ. В 1 группе ($n=30$), где проводилось только хирургическое лечение в 26,7% (8) определялась значимая вирусная нагрузка и 13,3% (4) выявлен онкобелок E7 ($p > 0,05$). Во 2 группе ($n=120$) при комплексном лечении отмечена эффективная нормализация Т-хелперов, Tregs, уровня экспрессии $CD95$ -маркера, TGF- β 1, FOXP3, уровня активности каспаз -8, -9, -3 и -6 в циркулирующих лимфоцитах ($p < 0,01$) и снижение ВПЧ-позитивных пациенток (до 1,7%).

Выводы. Полученные результаты обосновывают необходимость проведения комплексного изучения иммунного, воспалительного и ангиогенного профиля опухоли при разработке и прогнозировании эффективности стратегий комбинированной терапии преинвазивного и микроинвазивного РШМ. Изменения апоптотической программы в лимфоцитах периферической крови, молекулярных и иммунологических показателей у больных с CIN/cr in situ и IA_1 РШМ носят обратимый характер и восстанавливаются через 3 месяца после комплексного лечения.

МИКРОБИОТА ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ ПОЛОСТИ РТА У МОЛОДЫХ ПАЦИЕНТОВ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР

Колегова Е.С.¹, Кононова Л.А.², Федорова И.К.¹, Кульбакин Д.Е.¹, Жалсанова И.Ж.³, Зарубин А.А.³, Сивцев А.А.³, Скрябин Н.А.³, Денисов Е.В.¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (НИИ онкологии, Томский НИМЦ), Томск, Россия

²Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России (СибГМУ), Томск, Россия

³Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ), Томск, Россия

Актуальность. Омоложение плоскоклеточной карциномы полости рта (ПКПР) является актуальной проблемой в онкологии. Для молодых пациентов с ПКПР характерно агрессивное течение заболевания, малоэффективное применение стандартных схем лечения и отсутствие классических этиологических факторов, характерных для больных с опухолями головы и шеи: употребление табака, алкоголя и инфицирование вирусом папилломы человека. Вероятно, существуют другие этиологические факторы, способствующие развитию данного рака в молодом возрасте, в числе которых может быть и микробиом.

Цель. Изучение особенностей микробиома ПКПР у молодых пациентов

Материал и методы. Сформированы две группы больных ПКПР (T2-3N0-2M0) в возрасте до ($n=24$) и старше

45 лет ($n=12$), не получавших неоадьювантную химиотерапию. Материалом для исследования явилась опухолевая ткань. ДНК была выделена с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США). Далее была проведена амплификация 16S рДНК с использованием пары праймеров 341F и 805R к гипервариабельной области V3-V4 и массовое параллельное секвенирование образцов. Секвенирование проводилось на приборе Miseq (Illumina, США) с использованием набора Miseq V3 Reagents (600 cycles) (Illumina, США). Контроль качества прочтений проводили с использованием FastQC и multiQC, оценка микробных сообществ проведена с использованием программы kraken2 и баз данных по 16S субъединице. Статистическая обработка результатов — с использованием программы Statistica 10.

Основные результаты. Описан профиль микробиомного сообщества ПКПР у больных моложе и старше 45 лет. Выявлено увеличение количества сиквенсов бактерий рода *Anoxybacillus* и *Granulicatella* в 2,1 и в 2,9 раз, соответственно, в ткани ПКПР молодых пациентов и снижение в 4,0-8,5 раз содержания бактерий рода *Fusobacterium*, *Helcococcus*, *Klebsiella* и *Parvimonas* и в 3,4 раза вида *Propionibacterium asnes* по сравнению с возрастными. Вид *Streptococcus infantis* встречался только у молодых пациентов с ПКПР в 46% случаев. Изучена одногодичная общая, безрецидивная и безметастатическая выживаемость 24 молодых пациентов с ПКПР. У 6 человек (25%) развились рецидивы, у 4 человек (17%) появились гематогенные метастазы, 5 человек (21%) умерло в течение одного года после операции. Среди изучаемых микроорганизмов была показана значимая связь количества сиквенсов *Collinsella aerofaciens* ($p=0,028$) в ткани ПКПР с одногодичной безрецидивной выживаемостью пациентов мо-

ложе 45 лет; *Anoxybacillus kestanbolensis* ($p=0,042$) и *Neisseria cinerea* ($p=0,019$) — с одногодичной безметастатической выживаемостью пациентов моложе 45 лет; *Staphylococcus sciuri* ($p=0,030$), *Neisseria subflava* ($p=0,048$), *Arthrospira fusiformis* ($p=0,054$), *Loktanella vestfoldensis* ($p=0,054$) и *Streptococcus infantis* ($p=0,048$) — с одногодичной общей выживаемостью пациентов моложе 45 лет.

Выводы. Профиль микробиомного сообщества ПКПР у пациентов моложе 45 лет отличается от такового у больных старшего возраста и ассоциирован с прогрессированием заболевания. Полученные данные могут служить основой для разработки новых методов диагностики, прогноза и лечения данного заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ № МК-1940.2022.3 и при использовании оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

ГЛИОМА: АНАЛИЗ ГЕНОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕННОЙ СЕТИ

Майорова А.А.¹, Туркина В.А.¹, Ярема П.О.¹, Волков И.А.¹, Орлов Ю.Л.^{1,2}

¹ Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Актуальность. Глиома является наиболее распространенной первичной опухолью головного мозга. Исследование этого заболевания, поиск новых ассоциированных генов, а том числе с помощью инструментов биоинформатики, представляет актуальную биомедицинскую задачу.

По имеющимся данным, ежегодная заболеваемость глиомами составляет около 6 случаев на 100 000 человек во всем мире. Высокая смертность обусловлена отсутствием эффективных методов лечения и диагностических тестов [1].

Согласно пятой редакции классификации ВОЗ опухолей центральной нервной системы (ЦНС) 2021 года выделяют 4 основных типа диффузных глиом: (1) Диффузные глиомы, взрослый тип; (2) Диффузные глиомы низкой степени злокачественности, детский тип; (3) Диффузные глиомы высокой степени злокачественности, детский тип; (4) Ограниченные астроцитарные глиомы. Классификация глиом по степеням злокачественности (grade) в настоящее время производится на основании молекулярных и генетических характеристик опухолей. Компьютерная реконструкция генных сетей является важным аспектом изучения молекулярных механизмов онкологических заболеваний, в том числе глиомы и глиобластомы [2].

Цель. Диагностика глиом может столкнуться с трудностями, обусловленными факторами недостаточной специфичности и чувствительности лабораторных тестов, отсутствием методов диагностики, которые могут дать 100% гарантию правильного определения типа и степени злокачественности глиом, сложностью локализации опухоли [3]. Прогресс в изучении молекулярных характери-

стик опухолей ЦНС обеспечивает более точную диагностику и прогноз, снижает риск ошибки выборки и облегчает принятие клинических решений. Внедрение данного подхода в клинических испытаниях может позволить разработать более индивидуальные стратегии хирургического и нехирургического лечения в нейроонкологии. Цель — выработка методики реконструкции генной сети глиомы и поиска маркерных генов.

Методы. Использовались методы биоинформатики, онлайн инструменты, запросы к базам данных. Разработка выполнялась студентами на Цифровой Кафедре Сеченовского Университета в 2023 г. Мы провели анализ литературы и поиск релевантных генов с целью исследования взаимодействий между ними, реконструкции генной сети. Использовались литературные базы PubMed, PMC, интегративные биоинформационные ресурсы GeneCards.org, MalaCards.org, программные средства поиска ANDSystem, Biograph. Поиск литературы в (PubMed) показал резкий рост числа публикаций по теме «glioma» в последние несколько лет. Всего — 119,280 публикаций в период с 1870 по 2023 год.

За последнее столетие появилось множество новых технологий, которые оказали влияние на классификацию опухолей. К ним относятся световая микроскопия, гистохимическое окрашивание, электронная микроскопия, иммуногистохимия, молекулярная генетика, а в последнее время — различные подходы к широкому молекулярному профилированию. Также проявили себя методики, основанные на нуклеиновых кислотах (секвенирование ДНК и РНК, флуоресцентная гибридизация ДНК in situ, профилирование экспрессии РНК). Мы рассмотрели роль мутаций

в патогенезе глиом, функциональные взаимодействия и анализ интерактома (сети взаимодействий) генов глиомы, используя запросы к базам данных и онлайн-ресурсам OMIM.org, GeneMANIA, STRING-DB (<https://string-db.org/>).

Результаты. Выполнена компьютерная реконструкция геновой сети глиомы. Проведена функциональная аннотация узловых генов сети. В генезе глиом участвует множество генетических мутаций. Одним из наиболее изученных генетических изменений, связанных с глиомами, является мутация гена IDH1, которая наблюдается у приблизительно 70% инфильтрирующих глиом. Мутации в генах IDH1 и IDH2 могут влиять на ответ опухоли на химиотерапию. Рассмотрена делеция на хромосоме 1p/19q, которая обнаруживается у приблизительно половины опухолей типа «олигодендроглиома» и является взаимоисключающей для астроцитом (TP53). Это изменение связано с более благоприятным прогнозом и может использоваться для выбора подхода к лечению [1].

В генезе глиом могут участвовать мутации в генах, связанных с сигнальными путями роста и пролиферации клеток, таких как гены EGFR, PTEN, TP53, PIK3CA и другие [2]. В очень небольшом количестве случаев в клетках с мутациями в генах IDH1 или IDH2 выявлены также изменения в генах PTEN, EGFR, CDKN2A и CDKN2B. Вместе с этим в образцах с немутантными IDH1 и IDH2 встречаемость мутаций гена TP53 была существенно ниже (18%), в то время как мутации генов PTEN, EGFR, CDKN2A и CDKN2B присутствовали намного чаще (74%). Помимо известных генов, формируются новые группы молекулярных маркеров (KDM1A, HIF1A, EGFR, SMO, MSI2), связанных с канцерогенезом и возможных для использования в таргетной терапии глиальных опухолей. Хотя большинство глиом возникает спорадически без сопутствующего семейного заболевания, существует тесная связь между глиомами и несколькими редкими наследственными синдромами. К таким редким синдромам относятся, прежде всего, синдромы факотоза (нейрофиброматоз 1, туберозный склероз), синдром Ли-Фраумени

(LFS), энхондроматоз, синдром семейной атипичной множественной родинки (FAMMM), синдром Рубинштейна-Тайби.

Выводы. В целом, в ходе исследования:

— Собрана актуальная научная литература по глиомам.

— Расширен список генов, ассоциированных с глиомой, с использованием баз данных и онлайн-инструментов биоинформатики.

— Определены значимые категории генов онтологий для данного списка.

— Реконструирована геновая сеть для генов глиомы. В сети выявлены узловыe гены PIK3CA, KRAS, которые потенциально могут быть использованы как мишени для таргетной терапии, а также как молекулярно-генетические маркеры заболевания.

— Проанализированы структуры белков Pik3CA, KRas.

Построение геновых сетей с помощью STRING-DB позволяет визуализировать и анализировать взаимодействия между генами и белками. Подход выявляет ключевые генетические маркеры, сигнальные пути и биологические процессы, которые играют роль в развитии и прогрессии глиом, помочь идентифицировать новые потенциальные мишени для лечения.

Литература

1. Byun YH, Park CK. Classification and Diagnosis of Adult Glioma: A Scoping Review. *Brain Neurorehabil.* 2022 Nov 22;15(3):e23. doi: 10.12786/bn.2022.15.e23.

2. Gubanova NV, Orlova NG, Dergilev AI, Oparina NY, Orlov YL. Glioblastoma gene network reconstruction and ontology analysis by online bioinformatics tools. *J Integr Bioinform.* 2021 Nov 16;18(4):20210031. doi: 10.1515/jib-2021-0031.

3. Osborn AG, Louis DN, Poussaint TY, Linscott LL, Salzman KL. The 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: What Neuroradiologists Need to Know. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2022 Jul;43(7):928-937. doi: 10.3174/ajnr.A7462.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ И ПРОГНОЗ ТЕЧЕНИЯ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Михаленко Е. П.¹, Щаюк А.Н.¹, Шепетько М.Н.², Кильчевский А. В.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

² УО «Белорусский медицинский университет» (БГМУ), Минск, Республика Беларусь

Введение. Рак легкого является актуальной социально-биологической проблемой. Значение ее возрастает в связи с неуклонным ростом заболеваемости и смертности от рака легкого во многих экономически развитых регионах мира.

В настоящее время большое число фундаментальных исследований сфокусировано на поиске новых инновационных подходов к прогнозированию течения онкологических заболеваний и индивидуализации системной противоопухолевой терапии. Одним из самых актуальных направлений является понимание молекулярно-генетических и эпигенетических механизмов, приводящих к

прогрессированию и метастазированию злокачественных опухолей, что позволит открыть новые пути контроля опухолевого роста и усилить эффективность проводимого лечения. Ограниченное число данных по изучаемой проблеме, предположительный характер механизмов развития лекарственной устойчивости и отсутствие доказательных критериев прогноза на уровне нарушений генов обусловили актуальность и перспективность поиска новых молекулярных маркеров при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) для персонификации тактики лечения и определения прогноза течения заболевания у данной категории пациентов.

Целью данного исследования было провести анализ выживаемости пациентов с НМРЛ с учетом молекулярного профиля опухоли.

Материалы и методы. Для выявления молекулярного профиля опухоли немелкоклеточного рака легкого были отобраны 110 пациентов (54 пациентов с аденокарциномой (АК) и 56 с плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ)). Гистологический тип опухоли был определен согласно гистологическим критериям ВОЗ (2015). Сбор биологического материала проводился с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, в соответствии с анкетированием пациентов и разрешением этического комитета на исследование образцов тканей и биологических жидкостей.

Исследование мутационного статуса генов выполнялось методом высокопроизводительного секвенирования с использованием панелей TruSeq Amplicon — Cancer Panel и AmpliSeq for Illumina Cancer Hotspot Panel v2 на приборах MiSeq и NextSeq (Illumina). Полученные gVCF файлы после обработки Picisies были отфильтрованы по параметрам качества (QUAL) ≥ 30 , а также достаточно высокого показателя глубины чтения (DP), но исключая дубликаты, весь последующий анализ был проведен в Python & Julia.

Ts/Tv отношение было высчитано для каждого образца. Каждый gVCF файл был аннотирован с использованием SnpEff, SnpSift для получения статистического отчета мутаций по каждому образцу. Все типы мутации были аннотированы по базам данных: dbSNP, Cosmic, ClinVar, ExAC, 1000 Genomes Project, GWAS, dbNFSP, MSigDb и UniProt.

Результаты. В исследуемой выборке пациентов с НМРЛ наиболее часто выявлялись варианты в генах TP53 (55%), ERBB4 (29%), ATM (18%), RET (15%), KRAS (21%), PIK3CA (12%), EGFR (14%), FGFR2 (10%), STK11 (10%), CDH1 (8%).

Для изучения выживаемости использовали регрессионную модель пропорциональных рисков Кокса, которая показала значимость 5 мутаций: для аденокарциномы — мутации в генах CSF1R и KRAS, для плоскоклеточного рака легкого — мутации в генах IDH1, CDH1, STK11 (таблица). У пациентов с аденокарциномой общая выживаемость ниже у носителей мутаций G12C гена KRAS и S940* гена CSF1R, по сравнению с пациентами имеющих нормальную форму этих генов. У пациентов с плоскоклеточным раком легкого общая выживаемость ниже у носителей мутаций V392T гена CDH1, R82K гена IDH1 и D53Tfs*11 гена STK11, по сравнению с пациентами имеющих нормальную форму этих генов.

ТАБЛИЦА. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАРУШЕНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ВЫЖИВАЕМОСТЬЮ У ПАЦИЕНТОВ С АДЕНОКАРЦИНОМОЙ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

Мутация	Тип рака	Ген	Частота варианта	HR (95%)	p-value
p.S940*	АК	CSF1R	1-2%	3.2 (1.1 — 9.7)	0.037
p.G12C	АК	KRAS	14-40%	4.6 (1.1 — 19)	0.039
p.R82K	ПКРЛ	IDH1	1-2%	4.5 (1.2 — 17)	0.028
p.V392T	ПКРЛ	CDH1	9-19%	6.2 (1.2 — 31)	0.027
p.D53Tfs*11	ПКРЛ	STK11	1-5%	5.9 (1.2 — 29)	0.028

Мутации в гене KRAS ассоциированы со снижением выживаемости пациентов с онкопатологиями, а также неэффективностью терапии тирозинкиназными ингибиторами [1].

CSF1R (colony stimulating factor 1 receptor) представляет собой рецепторную тирозинкиназу, которая опосредует онкогенез в микроокружении опухоли и экспрессируется на опухоль-ассоциированных макрофагах. Высокий уровень экспрессии CSF1R коррелируют с плохой выживаемостью у пациентов с различными злокачественными новообразованиями [2].

Мутации онкоген IDH1 вызывают потерю нормальной ферментативной активности белка и позволяют получить новую функцию с активацией гипоксических путей [3].

CDH1 ген-супрессор опухолевого роста, кодирующий E-кадгерин — важнейший гликопротеин для эффективного межклеточного соединения. Считается, что потеря функции этого гена способствует прогрессированию рака за счет увеличения пролиферации, инвазии и/или метастазирования, что приводит к увеличению опухолевой инвазивности и ухудшению прогноза у пациентов [4].

Ген STK11 кодирует печеночную киназу LKB1 — онко-супрессор опухолей, который действует как измеритель энергии для поддержания выживаемости раковых клеток [1].

Заключение. Выявленные варианты могут использоваться как молекулярно-генетические маркеры прогноза течения конкретных гистологических типов немелкоклеточного рака легкого.

Литература.

1. CSF-1R expression in tumor-associated macrophages is associated with worse prognosis in classical Hodgkin lymphoma / Koh Y.W. [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. 2014, 141, 573–583.
2. Mutation patterns in a population-based non-small cell lung cancer cohort and prognostic impact of concomitant mutations in KRAS and TP53 or STK11 / La Fleur L. [et al.] // Lung Cancer. 2019, 130, 50-58.
3. The Landscape of the Anti-Kinase Activity of the IDH1 Inhibitors / Malarz K. [et al.] // Cancers (Basel). 2020, 12(3),536.
4. Molecular testing on bronchial washings for the diagnosis and predictive assessment of lung cancer / Roncarat R. [et al.] // Mol Oncol . 2020, 14(9),2163-2175.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ДО И ПОСЛЕ КУРСА РАДИОТЕРАПИИ

Михайлова Г.Ф., Цепенко В.В., Мурзаева А.В., Шинкаркина А.П.

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава Российской Федерации (МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал «НМИЦ радиологии» МЗ РФ), Обнинск, Россия

Введение. Рак слизистой оболочки полости рта (СОПР) является результатом накопления молекулярно-генетических структурных и численных нарушений, которые приводят к аномальной пролиферации клеток, предотвращают апоптоз и способствуют выживаемости этих дефектных клеток. При нарушении процесса митоза клеток возникает полисомия хромосом, что повышает нестабильность генома. Почти во всех случаях рака СОПР наблюдается амплификация различных генов, что способствует прогрессии опухоли. Молекулярно-цитогенетические нарушения обычно взаимосвязаны со снижением безрецидивной и общей продолжительности жизни [Pierssens D.C.G., et al., 2017]. Одним из методов лечения является фракционированная радиотерапия. Молекулярно-цитогенетический метод I-FISH позволяет выявить частоту клеток с нарушениями генома как в процессе лечения, так и после проведенной радиотерапии, что возможно поможет оценить эффективность лечения.

Цель и задачи. Оценить прогностическую значимость молекулярно-цитогенетических нарушений (амплификации генов *hTERT*, *EGFR*, *CCND1* и полисомии хромосом 3, 7, 11) в клетках плоскоклеточного рака орофарингеальной области до и после лечения.

Материалы и методы. Группу обследованных больных раком СОПР составили 14 человек со стадией заболевания T2 (3 человека), T3 (8 человек) и T4 (3 человек). Средний возраст пациентов 57 лет. Всем была проведена гамма-лучевая терапия. Суммарная очаговая доза СОД составляла от 18 — 31,2 Гр. В контрольную группу вошли 12 здоровых человек. Исследование проводилось методом

интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH) с использованием коммерческих наборов ДНК-зондов для генов *EGFR*, *CCND1* (Kreatech, Netherlands) и гена *hTERT* (CytoTest, USA). Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Axiolmager A-2 (Carl Zeiss, Germany) с набором фильтров DAPI, Orange/Green, Gold (Vysis, USA). Для каждого образца анализировали 100-300 интерфазных клеток с четко визуализированными сигналами. Обработку полученных результатов проводили с помощью стандартных методов статистического анализа.

Основные результаты. Исследование образцов слизистой оболочки полости рта у лиц контрольной группы выявило наличие клеток с полисомией хромосом 3, 7, 11, а также с амплификацией всех трех генов — *hTERT*, *EGFR* и *CCND1*, встречаемость которых не превышала 2%. Среднегрупповые частоты клеток с полисомией хромосом и амплификацией генов приведены в таблице. Исследование числа клеток с полисомией хромосом 3, 7, 11 в образцах слизистой оболочки полости рта у пациентов с раком до лечения показало высокую встречаемости клеток с этим нарушением генома. Частота клеток с полисомией хромосомы 3 в группе пациентов варьировала от 3,0% до 84,0%, с полисомией хромосомы 7 от 2,5% до 60,0%, с полисомией хромосомы 11 от 5,0% до 67,0%. Среднегрупповая частота клеток с полисомией каждой из трех хромосом статистически значимо ($p < 0,05$) превышала аналогичный показатель в контрольной группе. После проведенной γ -лучевой терапии наблюдалось статистически значимое снижение ($p < 0,05$) среднегрупповой частоты клеток с полисомией только для двух хромосом — 7 и 11.

Исследованные хромосомы/ гены	Среднегрупповая частота клеток с полисомией хромосом, %/ среднегрупповая частота клеток с амплификацией генов, % (число проанализированных клеток)		
	контроль	До лечения	После лечения
Хромосома3/ <i>hTERT</i>	1,3±0,2 (1000) 0,1±0,1 (1200)	24,1±0,9 (2100) 11,3±0,7 (2100)	26,8±1,3 (1200) 5,6±0,7 * (1200)
Хромосома7/ <i>EGFR</i>	0,7±0,2 (2500) 0,2±0,1 (2500)	25,8±0,9 (2600) 3,6±0,4 (2600)	15,7±0,7 * (3000) 14,1±0,6 * (3000)
Хромосома11/ <i>CCND1</i>	0,3±0,1 (2600) 0,2±0,1 (2600)	23,9±0,9 (2250) 12,0±0,7 (2250)	12,8±0,7 * (2250) 21,8±0,9 * (2250)

* – статистически значимое различие ($p < 0,05$) частоты клеток до и после лечения

Исследование частоты клеток с амплификацией генов *hTERT*, *EGFR* и *CCND1* в исследованных образцах пациентов до лечения, свидетельствовало о статистически значимом ($p < 0,05$) превышении этого показателя по сравнению с данными контрольной группы. Частота клеток с этим нару-

шением генома варьировала в диапазонах от 0 до 67,0% для гена *hTERT*, от 0 до 8,5% для гена *EGFR* и от 0 до 69,0% для гена *CCND1*. После проведенного курса γ -лучевой терапии наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) снижение уровня клеток с амплификацией только одного гена *hTERT*.

Частота клеток с амплификацией двух других исследованных генов *EGFR* и *CCND1*, наоборот, повысилась.

Заключение. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о молекулярно-цитогенетических нарушениях при раке слизистой оболочки полости рта, в которые вовлечены хромосомы 3, 7, 11 и расположенные на них гены *hTERT*, *EGFR* и *CCND1*, соответственно. Наиболее характерными нарушениями являются амплификация исследованных генов и полисомия соответствующих хромосом. Снижение частоты клеток с полисомией хромосом 7 и 11 может свидетельствовать о положительной динамике гибели опухолевых клеток после лучевой терапии.

При этом, сохраняющийся уровень клеток с полисомией хромосомы 3 может быть показателем физиологического ответа данной хромосомы на определенные окружающие изменения. Противоположная динамика наблюдается относительно клеток с амплификацией исследованных генов. После лучевой терапии частота клеток с амплификацией генов *EGFR* и *CCND1* повышается и, наоборот, снижается уровень клеток с амплификацией гена *hTERT*. Можно предположить, что этот процесс обусловлен различными путями активации генов. Полученные результаты дают основание для дальнейшего накопления данных и наблюдения за больными обследованной группы.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ НК-КЛЕТОК ПРИ ГЕНЕРАЦИИ IN VITRO У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Журиков Р. В.^{1,2}, Михайловский Н. В.¹, Рыбачук В. А.¹, Абакушина Е. В.¹

¹ ООО «Текон Медицинские приборы», Москва, Россия

² ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В. В. Закусова», Москва, Россия

Введение. Метод адоптивной терапии с использованием НК-клеток является одним из перспективных направлений развития современной иммунотерапии онкологических заболеваний [1]. Длительное культивирование в присутствии цитокинов и фидерных клеток позволяет получить популяцию НК-клеток, способную эффективно лизировать опухоли [2]. Экспрессия таких молекулярных маркеров как CD16, CD38 и HLA-DR представляет особый интерес для оценки цитотоксической способности, полученной в процессе культивирования, популяции НК-клеток. CD16 — определяет антителозависимую цитотоксичность [3]. CD38 — маркер активации, коэкспрессия которого вместе с CD16 определяет высокую цитолитическую активность НК-клеток [4]. HLA-DR — маркер поздней активации НК-клеток, говорящий о повышенной продукции цитокинов и готовности к дегрануляции [5].

Цель исследования — оценка экспрессии маркеров НК-клеток человека при их длительной генерации *in vitro*.

Материалы и методы. Мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови 10 пациентов с солидными опухолями на градиенте плотности Ficoll (Sigma-Aldrich) и культивировали в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) с добавлением ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21 с фидерными клетками K-562 в течение 14-18 дней. Подсчет клеток и оценку жизнеспособности проводили каждые 7 дней. Цитофлуориметрический анализ проводили на 0-й, 7-й и 14-й дни культивирования на цитометре Image Stream MkII (Luminex). Применяли 7-цветную панель меченых антител к CD3/45/56/16/HLA-DR/CD38 (BD Bioscience, Biolegend), для оценки жизнеспособности вносили витальный краситель 7AAD. Статистическую обработку результатов проводили с использованием парного Т-теста Стьюдента на программном обеспечении MS Excel 2016, результат считался достоверным при $p < 0.05$. Данные приведены в процентах от живых лейкоцитов (CD45+7AAD-) в виде среднего арифметического.

Результаты. До начала культивирования фенотип лимфоцитов соответствовал референсным значениям, кроме популяции CD3-CD45+CD56+: У 30% пациентов данный показатель превышал норму в 20%. Уровни маркеров HLA-DR и CD38 были менее 5%. На 7-ой и 14-ый день произошла экспансия популяции НК-клеток, средний индекс пролиферации составил 1227. На 7-ой и 14-ый дни культивирования достоверно увечились уровни экспрессии маркеров НК-клеток CD56 и составили в среднем 69% и 69.3% по сравнению с 15% на 0-й день, а также CD16- (42% на 7-й день, 69% на 14-ый день по сравнению с 12,6% на 0-й день. Экспрессия маркеров CD38 и HLA-DR на этих клетках достоверно увеличилась в 15 раз по сравнению с 0 днем уже на 7-й день и осталась на этом же уровне до 14-и дней. Содержание клеток с маркерами CD16, CD38 и HLA-DR на 14-ый день было больше, чем содержание на 0-й и 7-й дни. Уровень цитотоксических НК-клеток с фенотипом CD56DimCD16+ сохранился по сравнению с 0 днем, но при этом достоверно увеличилось в несколько раз содержание популяций этих клеток с экспрессией маркеров CD38 и HLA-DR. Процентное содержание лимфоцитов с цитокин-продуцирующим фенотипом CD56 BrightCD16- увеличилось в 3 раза по сравнению с 0 днем. Содержание НКТ-клеток (CD3+CD56+) на 7-ой день составило 3.9%, на 14-ый — 5,7%. Жизнеспособность клеток на всех этапах культивирования была на уровне 96% и выше.

Выводы. В процессе культивирования НК-клеток изменяется профиль экспрессии поверхностных маркеров в сторону активации. Применяемый метод культивации приводит не только к экспансии популяции НК-клеток в культуре, но и способствует их дифференциации в фенотип CD3-CD45+CD56+CD38+HLA-DR+ с высокой способностью к цитотоксической активности. Данную технологию можно применять для получения клеточного продукта и проведения адоптивной иммунотерапии онкологическим больным.

Литература:

1. Laskowski T., Biederstädt A., Rezvani K. Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy// *Nature Reviews Cancer*. 2022. Vol 22. P. 557-575
2. Abakushina E.V., Popova L., Zamyatin A. et al. The advantages and challenges of anticancer dendritic cell vaccines and NK cells in adoptive cell immunotherapy // *Vaccines*. 2021. Vol. 9. № 11. P. 1363
3. Meng F., Zhang S., Xie J. et al. Leveraging CD16 fusion receptors to remodel the immune response for

enhancing anti-tumor immunotherapy in iPSC-derived NK cells//*Journal of Hematology & Oncology* 2023. Vol. 16. 62.

4. Zambello R., Barlia G., Manni S. et al. NK cells and CD38: Implication for (Immuno) Therapy in Plasma Cell Dyscrasias// *Cells*. 2020. Vol. 9. №3. P.768

5. Erokhina S.A., Streltsova M.A., Kanevskiy L.M. et al. HLA-DR-expressing NK cells: Effective killers suspected for antigen presentation.//*Journal of Leukocyte Biology*. 2021. Vol. 109, № 2. P. 327-337

МЫШИНАЯ МОДЕЛЬ НЕЙРОБЛАСТОМЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ GD2 И B7-H3

Луцкович Д.В.¹, Ерофеева А-М.В.², Клыч А.В.¹, Маньковская С.В.², Мелешко А.Н.¹

¹ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии, иммунологии и иммунологии, д. Боровляны, Беларусь

² Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Актуальность. Нейробластома (НБ) — наиболее часто встречающийся экстракраниальный солидный рак у детей. Эффективное лечение пациентов высокой группы риска продолжает оставаться серьезной проблемой детской онкологии. Применение искусственных химерных антигенных рецепторов (chimeric antigen receptors, CARs) на поверхности Т-лимфоцитов — одно из перспективных направлений иммунотерапии данного заболевания. Известно, что характерными поверхностными маркерами нейробластомы являются дисиаialogанглиозид (GD2) и белок B7-H3, также известный как CD276 [Moghimi B et al., 2021].

На сегодняшний день в экспериментальной онкологии преимущественно используют мышиные модели, которые позволяют не только провести первичную оценку эффективности фармакологических средств, но и разрабатывать новые подходы к локальному лечению онкозаболевания, изучать взаимодействие опухоли с микроокружением, её биологию роста.

Цель. Создание сингенной модели НБ с возможностью таргетирования GD2 и B7-H3.

Материалы и методы. GD2+клеточная линия мышины нейробластомы NXS2 предоставлена проф. Лоде (Грейфсвальд, Германия). Клетки NXS2 культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% антибиотика/антимикотика. Клеточную линию HEK293T содержали в той же питательной среде, но с добавлением селективного антибиотика G418.

Ген фермента биолюминесценции люцифераза светлячка (Luc) клонирован из плазмиды *pT7luc* (коллекция Института микробиологии НАН Беларуси) в лентивирусный вектор *pUltra* во втором положении после зеленого флуоресцентного белка (GFP) через 2-А пептид по сайтам рестрикции BamHI:SalI. Полноразмерная кДНК длинной изоформы 4lg гена B7-H3 (CD276) амплифицирована из общей кДНК образца нейробластомы и клонирована в вектор *pWPXL* по сайтам BamHI:EcoRI. Опухолевые клет-

ки NXS2 были трансдуцированы концентрированными лентивирусными частицами, содержащие высокий титр VSVG-псевдотипированных *pUltra_GFP-Luc* и *pUltra_B7-H3* с добавлением 6 мкг/мл полибрена. Псевдотипированные лентивирусные частицы были получены путем ко-трансфекции клеток HEK293T. Экспрессия GFP и B7-H3 в клеточной культуре была подтверждена проточной цитометрией и составила 99,3% и 97,6 % соответственно.

Приживление опухоли проводили путем подкожной инъекции суспензии клеток NXS2_GFP-Luc и NXS2_B7-H3 в количестве $1,5 \cdot 10^6$ клеток в 100 мкл фосфатно-солевого буфера в область бедра мыши, однократно. Всего использовали 24 мыши линии A/J в возрасте 6-8 недель, которые были разделены на три группы (контрольную и две опытные) по 4 самца и 4 самки в каждой. Для оценки динамики роста новообразования раз в 5 дней измеряли объем опухоли с помощью цифрового калипера, а также производили прижизненную съемку мышей через 15 мин после внутрибрюшинного введения люцифераина на визуализаторе IVIS (США). Период мониторинга составил 20 суток, общий период наблюдения составил 45 дней.

Результаты. Общее состояние и поведение животных после имплантации суспензий клеточной линии мышины нейробластомы NXS2 носили нормальный характер. Все животные были активны, подвижны, реагировали на раздражители, охотно поедали корм и потребляли воду. В течение первых 20 дней наблюдения статистически значимых различий по массе тела, потреблению пищи и воды не зафиксировано.

На 9-10 сутки появились первые признаки развития опухолевого процесса с доступным для измерения первичным очагом, который изначально не пальпировался. На 20 сутки зафиксировано отсутствие новообразования у 2 мышей, из них у 1 (12,5%) из группы NXS2_GFP-Luc и у 1 (12,5%) из группы NXS2_B7-H3. При этом по данным флуоресцентной визуализации оказалось, что злокачественные клетки остаются жизнеспособными до 10 суток. Эти

результаты, скорее всего, указывали на то, что у некоторых животных иммунный ответ вызвал отторжение опухолевых клеток до формирования новообразования.

Медиана объема опухоли на 10, 15 и 20 сутки наблюдения для группы NXS2_GFP_Luc составила соответственно 46,18 мм³, 142,70 мм³ и 589,52 мм³, а для группы NXS2_B7-H3 — 52,50 мм³, 214,34 мм³ и 684,52 мм³. Статистической достоверной разницы в размерах новообразования в зависимости от типа введенных клеток и пола животного не установлено.

Медиана общей выживаемости составила 37,5 (30; 45) дней со дня введения суспензий трансгенных клеточных линий мышинной нейробластомы NXS2.

Заключение. Созданная модель мышинной нейробластомы, экспрессирующая белки GD2 и B7-H3, пригодна для отработки методики экспериментального лечения. По совокупности полученных данных оптимальным периодом для проведения специальной противоопухолевой терапии является 11-13 день с момента прививки злокачественных клеток.

ОЦЕНКА ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНА RASSF1 ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

Смирнов С.Ю.¹, Медведь А.В.¹, Кундас Л.А.², Субоч Е.И.¹, Портянко А.С.¹

¹ РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

² Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Введение. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) остается ведущей причиной смертности от злокачественных новообразований в мире. Анализ циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) позволяет улучшить как диагностику данного заболевания, так и качество оказываемой медицинской помощи. Современные подходы к исследованию цоДНК при НМРЛ основаны или на детекции широкого спектра патогенных вариантов в генах KRAS, EGFR, BRAF и др., встречающихся не более 40% всех пациентов, или же на использовании дорогостоящего метода секвенирования нового поколения. Согласно литературным данным, метилирование промоторных областей ряда генов (RASSF1, SHOX2 и др.) может являться универсальным диагностическим маркером НМРЛ. Разработка методов детекции данных нарушений с использованием метода цифровой-капельной ПЦР позволит проводить качественный и количественный анализ цоДНК у большего числа пациентов и с меньшими финансовыми затратами.

Цель. Осуществить выбор опухоль-специфичных метилированных CpG нуклеотидов промоторных областей гена RASSF1 для разработки универсального метода детекции цоДНК при НМРЛ.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужила информация из международной базы данных The Cancer Genome Atlas. Для оценки статуса метилирования промоторов гена RASSF1A использованы данные 780 образцов опухолевой ткани НМРЛ I-IV стадии заболевания (аденокарцинома — 419, плоскоклеточный рак легкого — 361) и 76 образцов нормальной ткани легкого (проекты TCGA-LUAD, TCGA-SCC). Используемая панель для исследования — Infinium HumanMethylation 450 BeadChip. Исследуемые CpG нуклеотиды: первый промотор — cg06172942, cg25486143, cg27569446, cg21554552, cg25747192, cg08047457, cg12966367, cg04743654, cg00777121, cg13872831, cg24859722; второй промотор — cg07130266, cg06117233, cg23147362, cg20826201, cg00743929, cg09386807, cg02930432, cg21418575, cg06821120, cg08078366, cg15043975, cg22796393, cg26093954, cg06375085, cg27149285, cg21522636,

cg19152024, cg13497155, cg10152523, cg11035216, cg07344955, cg14884256 и cg06063729. Обработка данных — SeSAMe Methylation Beta Estimation. Пороговый уровень детекции метилированных нуклеотидов — 0,3. Статистический анализ данных проведен с использованием точного критерия Фишера.

Результаты. В образцах нормальной ткани легкого не обнаружено метилирования CpG нуклеотидов первой промоторной области гена RASSF1 за исключением одиночного нуклеотида cg24859722. В 25% случаев плоскоклеточного рака легкого и 18% случаев аденокарциномы, наблюдалась потеря метильной группы в данном положении. При анализе нуклеотидной последовательности в области cg24859722 обнаружен сайт связывания транскрипционного фактора FOXA1.

В сравнении с нормальной тканью, образцы НМРЛ характеризовались наличием метилированной области (cg27569446-cg12966367) в 39% случаев аденокарциномы и 28% — плоскоклеточного рака легкого. Установлено, что большинство CpG нуклеотидов метилированной области локализируются в нуклеотидных последовательностях для связывания транскрипционных факторов генов TP53 и PAX-2.

Кроме того, обнаружены независимо метилированные друг от друга соседние CpG нуклеотиды cg06172942 (аденокарцинома — 53% плоскоклеточный рак — 41,8%) и cg25486143 (аденокарцинома — 35,3%, плоскоклеточный рак — 26,3%), расположенные на 5' конце первой промоторной области.

На 3' конце первого промотора гена RASSF1 в образцах НМРЛ выявлено гиперметилирование CpG нуклеотидов cg00777121 и cg13872831 в 39%/36% и 33%/36% случаев аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого соответственно. В связи со значительным удалением данных CpG нуклеотидов от области cg27569446 — cg12966367 (>90 и 200 bp соответственно) можно предположить, что они входят в состав других независимо метилированных областей гена.

При исследовании второй промоторной области гена RASSF1, отвечающей за экспрессию онкогенной изофор-

мы RASSF1C, во всех образцах нормальной ткани обнаружено метилирование CpG нуклеотидов cg07130266 и cg06117233, а также области cg09386807 — cg06821120 на 5' конце промотора. Данные CpG нуклеотиды входят в нуклеотидные последовательности целого ряда сайтов связывания различных транскрипционных факторов (TFII-I, c-Ets-1, STAT1b, IRF-1, E2F-1, GR- α , T3R-b1, NF-AT1, PAX-5, TP53 и ENKTF). Между указанными метилированными участками расположены не метилированные CpG нуклеотиды cg23147362, cg20826201 и cg00743929. На 3' конце второго промотора метилирования нуклеотидов, включенных в панель, не обнаружено.

В сравнении с нормальной тканью, в образцах НМРЛ отмечена утрата метилирования или всей области cg09386807 — cg06821120 (аденокарцинома — 37,7%, плоскоклеточный рак — 30,2%) или же отдельных CpG нуклеотидов (аденокарцинома — 23,6%, плоскоклеточный рак — 22,4%). Потеря метилирования CpG нуклеотидов cg07130266 или cg06117233 обнаружена в 54,8% случаев аденокарциномы и 39,3% — плоскоклеточного рака легкого. При этом данные нарушения детектировались только у пациентов с утратой метилирования CpG нуклеотидов области cg09386807 — cg06821120.

Гиперметилирование CpG нуклеотидов cg20826201 и/или cg00743929 выявлено в 32,4% случаев плоскоклеточного рака легкого и 13,1% случаев аденокарциномы ($p < 0,05$). Также для плоскоклеточного рака отмечена более высокая частота метилирования цитозина cg23147362 (19,7% против 2,9%; $p < 0,05$). Стоит отметить, что при анализе нуклеотидной последовательности в области данного CpG нуклеотида не обнаружено специфических сайтов связывания транскрипционных факторов. Гиперметилирование CpG нуклеотидов cg23147362, cg20826201 и cg00743929 в большинстве случаев (98,8%) наблюдалось в образцах с отсутствием aberrантного метилирования иных регионов второго промотора гена RASSF1.

Заключение. Таким образом, использование праймеров для метил-специфической ПЦР (МСП), захватывающих область cg27569446-cg12966367 в первом промоторе гена RASSF1, может позволить детектировать от 30% до 40% всех случаев распространенных форм плоскоклеточного рака легкого и аденокарциномы соответственно. Дополнительное включение в исследовательскую панель участка гена с CpG нуклеотидами cg23147362, cg20826201 и cg00743929 из второй промоторной области, может повысить данный показатель при плоскоклеточном раке легкого до 46%.

ОЦЕНКА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МАЛЫХ РНК ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Пушкин А.А.¹, Ряховский С.С.¹, Малек А.В.², Курносков И.А.²

¹ Университет ИТМО, г. Санкт-Петербург

² ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Актуальность. Диагностика опухолей головного мозга затруднена из-за их разнообразных симптомов, которые могут быть неспецифичными и проявляться в виде головных болей, головокружений, судорог или изменений в зрении или слухе. Кроме того, эти симптомы могут быть связаны с другими заболеваниями, что затрудняет дифференциальную диагностику. Для диагностики здесь используются различные методы обследования, включая нейровизуализацию. Однако, даже при использовании всех доступных методов диагностики, точное определение типа и стадии опухоли зачастую затруднено и дооперационное лечение невозможно.

Недавние исследования показали, что циркулирующие микроРНК могут служить биомаркерами для диагностики опухолей головного мозга. Они могут быть обнаружены в крови и других биологических жидкостях. Исследования демонстрируют, что у пациентов с опухолями головного мозга уровень определенных микроРНК в крови может быть изменен. Например, некоторые микроРНК повышены в случае наличия опухоли, в то время как другие могут быть снижены. Эти изменения могут иметь связь с биологическими особенностями трансформированных клеток: активной пролиферацией, способностью к инвазии и метастазированию.

Однако, необходимы дальнейшие исследования, чтобы подтвердить эффективность и надежность этих молекул

в качестве диагностических маркеров. Также необходимо разработать стандартизированные протоколы для сбора образцов, исследования и интерпретации получаемых данных.

Цель. Оценить потенциал циркулирующих микроРНК в плазме крови в качестве надежных биологических маркеров глиобластомы головного мозга.

Методы. В исследовании были использованы базы данных секвенирования микроРНК (SRP262521 и SRP337938 базы SRA в формате fastq) для 170 образцов условно-здоровых доноров и 77 образцов пациентов с глиобластомой. Анализ данных проводили с использованием miRdeep 2.0 и miRBase 22.0. Для выявления наиболее диагностически-значимых молекул использовали алгоритмы k-ближайших соседей и случайного леса с использованием CPM-нормализованных показателей экспрессии микроРНК. Для получения формулы диагностического значения использовали логистическую регрессию.

Выводы. Анализ экспрессии микроРНК, отобранных методами машинного обучения, с использованием логистической регрессии позволил определить потенциально маркерные микроРНК (miRNA-5010-3p, miRNA-670-3p, miRNA-6782-5p, miRNA-1225-3p, miRNA-6720-5p, miRNA-654-5p, miRNA-1304-5p, miRNA-758-3p, miRNA-1180-3p, miRNA-6852-3p и miRNA-3180-3p) и подобрать наиболее информативные коэффициенты для расчета показателей экспрессии.

Была получена формула с целью определения диагностического значения: $0.201 * \text{CPM} \text{ miRNA-5010-3p} + 0.143 * \text{CPM} \text{ miRNA-670-3p} + 0.169 * \text{CPM} \text{ miRNA-6782-5p} + 0.160 * \text{CPM} \text{ miRNA-1225-3p} + 0.111 * \text{CPM} \text{ miRNA-6720-5p} + 0.091 * \text{CPM} \text{ miRNA-654-5p} + 0.121 * \text{CPM} \text{ miRNA-1304-5p} + 0.121 * \text{CPM} \text{ miRNA-758-3p} + 0.117 * \text{CPM} \text{ miRNA-1180-3p} + 0.129 * \text{CPM} \text{ miRNA-6852-3p} + 0.133 * \text{CPM} \text{ miRNA-3180-3p}$, где CPM — показатели экспрессии микроРНК, полученные в результате секвенирования; 0.201, 0.143, 0.169, 0.160, 0.111, 0.091, 0.121, 0.121, 0.117, 0.129, 0.133 — коэффициенты, полученные в результате логистической регрессии. Дополнительно был получен порог диагностического значения, разделяющий группу пациентов с глиобластомой и условно-здоровую группу добровольцев. Диагностическое значение выше 137.554 характерно для пациентов с глиобластомой с чувствительностью и специфичностью 97.6% и 95.3% соответственно.

В результате анализа становится понятно, что исследование циркулирующих микроРНК методом высокопроизводительного секвенирования может выступать в качестве нового метода неинвазивной диагностики глиобластом. Разработка и внедрения этого метода позволит снизить риски, связанные с диагностической операцией, и стоимость диагностики в целом. Авторы понимают, что полученные значения чувствительности и специфичности могут быть изменены при исследовании более широкой и гетерогенной выборки. Для валидации полученной диагностической модели будет проведено секвенирование образцов плазмы пациентов нейрохирургического отделения ФГБУ «НМИЦ онкологии Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Дополнительная финансовая поддержка исследования была получена от Фонда содействия инновациям в рамках программы «УМНИК» по договору №173117ГУ/2022.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР: ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ

Горбенко А.С.^{1,2}, Столяр М.А.^{1,2}, Галанин В.В.³, Бахтина В.И.^{3,4}, Комаровский Ю.Ю.^{1,2}, Ольховский И.А.^{1,2}

¹ Красноярский филиал ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Красноярск, Россия

² ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

³ КГБУЗ Красноярская краевая клиническая больница, Красноярск, Россия

⁴ ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск, Россия

Введение. Выявление цитогенетических поломок в лейкозных клетках включены в клинические рекомендации в качестве важных диагностических критериев. Вместе с тем, примерно в половине случаев острого лейкоза (ОЛ) не удается найти какие-либо нарушения кариотипа, что обуславливает актуальность поиска новых молекулярных маркеров, основанных, в том числе на оценке профиля экспрессии РНК. Поскольку широкое применение в клинической практике транскриптомого анализа сдерживается дороговизной аналитических платформ на основе микрочипирования и секвенирования РНК, возможное решение заключается в использовании ПЦР тестирования ограниченного числа наиболее информативных РНК-маркеров. Ранее были описаны методы ОТ-ПЦР для одновременного высокочувствительного обнаружения десятков химерных транскриптов слитых при хромосомных транслокациях генов. При ОЛ также известно увеличение уровня мРНК ряда генов, экспрессия которых характерна для клеток с высокой пролиферативной активностью, таких как *WT1*, *BAALC*, *HMG2*, *EVI1* и *PRAME*. Одновременное комплексное исследование указанных мРНК и химерных транскриптов в одном биологическом образце методами ПЦР-РВ ранее не было описано.

Цель работы заключалась в разработке способа комплексного исследования мРНК и химерных транскриптов у пациентов с острым лейкозом с использованием мультиплексного варианта ПЦР-РВ.

Материалы и методы. Для выполнения мультиплексной ПЦР использовали известные и оригинальные олиго-

нуклеотидные праймеры и зонды, подбирая оптимальный вариант их комбинаций. Оптимизация реакции и оценка аналитической чувствительности специфичности выполнялась с использованием разработанных плазмидных стандартных калибраторов. Выделение РНК из лейкоцитов венозной крови и обратную транскрипцию проводили с использованием наборов реагентов ООО «Формула гена». Амплификацию и детекцию результатов выполняли с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad). Тестирование выполнялось в образцах венозной крови 160 взрослых пациентов с первично выявленным ОЛ в два этапа. На первом этапе использовался тест «Лейкомоскрин» позволяющий одновременно определить все пять мРНК *WT1*, *BAALC*, *HMG2*, *EVI1* и *PRAME*. На втором этапе использовался тот же образец выделенной РНК для мультиплексной реакции «Лейкомодифф» на 16 химерных транскриптов, наиболее часто выявляемых при острых лейкозах. В качестве контрольной группы использовали образцы крови пациентов, не имеющих онкологических заболеваний. 39 пациентов контрольной группы не имели нарушений гемограммы, а у 48 регистрировались сдвиги, которые могут быть при онкогематологических заболеваниях: анемия, тромбоцитопения или лейкоцитозы.

Результаты. Уровень мРНК исследуемых генов, характеризовался высокой межиндивидуальной вариацией и их значения не коррелировали с количеством циркулирующих лейкоцитов или бластных клеток крови. Частота выявления более высоких ($p < 0,05$) уровней мРНК исследуемых генов

двух генов при ОЛ составляла от 14% (PRAME) до 89% (WT1) (таблица 1). Результаты ROC анализа показали 96% чувствительность и 71% специфичность (95% ДИ: 0,782-0,895, AUC=0,844). У пациентов наблюдались более высокие уровни мРНК BAALC при остром миелобластном лейкозе (ОМЛ) и остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ), повышенные значения мРНК PRAME при ОМЛ и остром промиелоцитарном лейкозе (ОПЛ), но более низкие уровни HMGA2 при ОПЛ. Пробы крови с повышенной экспрессией WT1 преимущественно принадлежали пациентам

ОМЛ и сочетались со статистически значимым снижением уровня экспрессии мРНК HMGA2 и более высокими значениями мРНК BAALC. Более того, при оценке преимущественной экспрессии отдельных мРНК выявленные разные типы (ВЕРН-критерий [1]) их соотношений при разных вариантах лейкемии. Суммарная выявляемость разных исследуемых химерных транскриптов у пациентов с ОЛ составила 17%, но значительно отличалась по частоте и структуре выявления в зависимости от гиперэкспрессии отдельных мРНК.

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ (МЕ (Q25-Q75) КОПИЙ /10⁴ КОПИЙ ABL1) МРНК BAALC, EVI1, PRAME И HMGA2 В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ

мРНК	Контрольная группа	Пациенты с острым лейкозом	Кол-во пациентов ОЛ с повышенной экспрессией (p<0,05)	
			всего	из них с наличием химерных транскриптов
WT1	0 (0,0001 – 0,1)	0,97 (0,11 – 4,05)	146	20 (14%)
BAALC	2,92 (1,37 – 5,66)	21,26 (4,36 – 170,2)	62	13 (21%)
HMGA2	0,79 (0,33 – 1,28)	0,28 (0,0 – 3,64)	41	1 (2,4%)
EVI1	0,68 (0,19 – 1,96)	0,17 (0,0 – 4,17)	32	2 (6,2%)
PRAME	0,13 (0,001 – 2,94)	1,21 (0,068 – 22,63)	18	4 (22,2%)

Заключение. Разработанные мультиплексные методы ПЦР-РВ для выявления мРНК генов, экспрессия которых характерна для клеток с высокой пролиферативной активностью и одновременно специфичных химерных транскриптов позволяют выполнять поиск молекулярных маркеров ОЛ в одном образце крови сразу после стандартного гематологического анализа, что существенно сокращает затраты и сроки постановки диагноза.

Список литературы:

1. Ольховский И.А., Горбенко А.С., Столяр М.А., Бахтина В.И., Михалёв М.А., Ольховик Т.И., Судариков А.Б., Сидорова Ю.С., Поспелова Т.И., Колесникова М.А., Капорская Т.С., Лыскова В.А. Исследование мРНК генов WT1, BAALC, EVI1, PRAME и HMGA2 в образцах цельной крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (10): 613-620. doi: 10.51620/0869-2084-2022-67-10-613-620

ЗАВИСИМОСТЬ УРОВНЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГРУППЫ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК ОТ ЭТАПА ДИССЕМИНАЦИИ РАКА ЯИЧНИКОВ

Пронина И.В.¹, Бурденный А.М.¹, Филиппова Е.А.¹, Лукина С.С.¹, Иванова Н.А.¹, Логинов В.И.¹, Казубская Т.П.², Кушлинский Н.Е.², Брага Э.А.¹

¹ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, РФ;

² ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, РФ

Рак яичников (РЯ) развивается бессимптомно до поздних стадий, характеризующихся образованием метастазов, и часто обладает сниженным ответом на химиотерапию. Различают три типа метастазирования рака яичников: лимфогенное, гематогенное и перитонеальное. Распространение опухоли в брюшину (перитонеальное метастазирование) связано с развитием асцита и неблагоприятным прогнозом.

Цель исследования — определить изменения уровня метилирования группы генов длинных некодирующих РНК (днРНК) на разных стадиях прогрессирования РЯ.

Уровень метилирования семи генов днРНК (LINC00472, LINC00886, MAFG-DT, SNHG1, SNHG6, TP53TG1,

TUG1) впервые изучен методом количественной метилспецифической ПЦР в 93 образцах опухолей яичников и 75 парных образцах гистологически нормальной ткани, а также в 29 перитонеальных макроскопических метастазах. С помощью непараметрического критерия Манна-Уитни показано статистически значимое (p<0,001) повышение уровня метилирования генов LINC00886, SNHG1, SNHG6 и TUG1 в опухолевой ткани. Для генов LINC00472, LINC00886 и SNHG6 выявлена достоверная связь с клинической стадией (p≤0,001), а для LINC00472 (p<0,001) и SNHG6 (p=0,005) — с появлением метастазов. Отмечено достоверное повышение уровня метилирования MAFG-DT и TP53TG1 (p<0,001), а также снижение метилирования

LINC00886 ($p=0,003$) в перитонеальных метастазах относительно первичного очага.

Метилирование генов LINC00472 и SNHG6 можно рассматривать как фактор инициации метастазирования РЯ, а метилирование генов LINC00886, MAFG-DT и TP53TG1 — как фактор колонизации метастазов в брюшине. Таким образом, показана взаимосвязь между метилированием группы генов днРНК на разных стадиях дис-

семинации РЯ, что важно для понимания механизмов этих процессов и разработки инновационных подходов к терапии РЯ.

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант № 20-15-00368П).

Ключевые слова: рак яичников, длинные некодирующие РНК, метилирование ДНК, перитонеальные метастазы.

ГРУППА АБЕРРАНТНО ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ МИКРОРНК В РАЗРАБОТКЕ МИШЕНЕЙ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОГО ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА

Пронина И.В., Логинов В.И., Брага Э.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР) имеет агрессивное течение и высокую частоту метастазирования (25-30%). Метастазирующий скПКР крайне устойчив к терапии — чувствительными к химио-, радио- или иммунотерапии оказываются менее 10% опухолей. Повышение частоты летальных исходов и устойчивости к терапии при метастазировании показывают необходимость поиска новых молекулярных маркеров для ранней диагностики и выявления метастазирования. Такими маркерами могут стать микроРНК. Кроме того, микроРНК или их ингибиторы могут быть использованы в терапии скПКР. Взаимодействие регуляторных микроРНК с мРНК приводит к деградации мРНК и остановке трансляции. Таким образом в перспективе возможно осуществлять регуляцию трансляции различных онкозначимых белков. Определение взаимодействующих пар микроРНК — мРНК онкозначимых белков позволит определить новые звенья в цепях сигнальных путей и послужит основой для разработки таргетной терапии.

Целью нашего исследования было определение aberrантно экспрессирующихся при скПКР микроРНК, корреляционное сравнение изменения их экспрессии с изменением экспрессии регулируемых ими мРНК и выбор нескольких пар микроРНК — мРНК, которые в перспективе могли бы быть использованы в таргетной терапии.

70 парных образцов скПКР (резекционный материал первичных опухолей и прилежащих гистологически нормальных тканей) получены из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ. Выделение РНК проводили классическим методом экстракции смесью гуанидинизотиоцианат-фенол-хлороформ. Уровни экспрессии определяли методом обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР. кДНК белок-кодирующих генов синтезировали с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (Thermo Fisher Scientific, США) и вырожденных гептамеров. В качестве референсного гена при ПЦР использовали *B2M*. Анализ экспрессии микроРНК проводили с использованием сертифицированных наборов TaqMan® MicroRNA Assays (Applied

Biosystems, США). В качестве референсных брали микроРНК RNU6B и RNU48.

Статистический анализ проводили с применением точного критерия Фишера. Изменения считались значимыми при $p \leq 0,05$. Конкордантность данных по экспрессии оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена.

Нами определены профили экспрессии 20 микроРНК (miR-34a-5p, miR-34b-3p, miR-34c-3p, miR-9-5p, miR-124a-3p, miR-148a-3p, miR-132-3p, miR-137, miR-17-5p, miR-191-5p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-125b-5p, miR-193-5p, miR-203a, miR-212-3p, miR-219a-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p, miR-375) и 11 опухоль-ассоциированных генов (*RASSF1(A)*, *SEMA3B*, *RARB(2)*, *GPX1*, *USP4*, *NKIRAS1*, *RHOA*, *CHL1*, *DAG1*, *APAF1*, *BCL2*), к числу которых относятся и экспериментально валидированные гены-супрессоры рака, и онкогены. Статистически значимое снижение уровня экспрессии показано для генов *SEMA3B*, *CHL1*, *RHOA*, *NKIRAS1*, *APAF1* ($p < 0,001$) и *DAG1* ($p = 0,02$). Показано достоверно частое снижение уровней 14 микроРНК: miR-124a-3p, miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-132-3p, miR-17-5p, miR-191-5p, miR-203a, miR-212-3p, miR-339-3p, miR-34b-3p, miR-34c-3p, miR-375, miR-9-5p ($p < 0,01$).

MiR-129-5p биоинформатически предсказана как микроРНК, способная регулировать шесть опухоль-ассоциированных генов: *SEMA3B*, *RHOA*, *GPX1*, *RARB(2)*, *NKIRAS1* и *CHL1*. Возможность взаимодействия miR-129-5p с пятью генами предсказана тремя алгоритмами, рекомендованными miRWalk2.0, а связывание miR-129-5p с *GPX1* — четырьмя алгоритмами. При сопоставлении уровней экспрессии микроРНК и мРНК определены пары со значимыми отрицательными корреляциями по Спирмену: *NKIRAS1* — miR-129-5p ($rs = -0,63$, $p < 0,001$); *CHL1* — miR-129-5p ($rs = -0,47$, $p < 0,01$); *CHL1* — miR-375 ($rs = -0,41$, $p < 0,05$); *RARB(2)* — miR-129-5p ($rs = -0,31$, $p < 0,05$); *RHOA* — miR-9-5p ($rs = -0,31$, $p < 0,05$); *APAF1* — miR-34a-5p ($rs = -0,59$, $p < 0,01$); *APAF1* — miR-375 ($rs = -0,39$, $p < 0,05$); *BCL2* — miR-193-5p ($rs = -0,45$, $p < 0,05$).

Таким образом, нами определены восемь пар микроРНК — мРНК, для которых показана значимая отри-

цательная корреляция уровней экспрессии при скПРК. Выявленные корреляции предполагают прямое связывание микроРНК с соответствующими генами или опосредованное влияние через медиаторы в общих сигнальных путях, что может быть использовано в таргетной терапии скПРК.

Работа выполнена за счет средств государственного задания № FGFU-2022-0007 Министерства науки и высшего образования РФ.

Ключевые слова: светлоклеточный почечноклеточный рак, регуляция экспрессии, микроРНК, онкогены, таргетная терапия.

ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК В ОБРАЗЦАХ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ С РАЗЛИЧНЫМИ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ

Смирнов С.Ю.¹, Медведь А.В.¹, Скачкова В.О.¹, Кундас Л.А.², Хожовец М.В.¹, Субоч Е.И.¹, Портянко А.С.¹

¹ РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

² Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Введение. Увеальная меланома (УМ) — это редкий подтип меланомы (≈5%), который возникает в результате злокачественной трансформации меланоцитов сосудистой оболочки глазного яблока. При этом УМ является наиболее часто встречающейся злокачественной опухолью среди всех внутриглазных новообразований: на ее долю приходится около 80% всей офтальмологической онкопатологии. В 2021 году в Республике Беларусь выявлено 122 новых случая УМ. Наиболее распространёнными генетическими нарушениями при данной патологии являются патогенные варианты в генах GNAQ, GNA11, BAP1 и SF3B1. Однако, молекулярные особенности канцерогенеза у пациентов с мутациями в указанных генах в настоящее время мало изучены.

Цель. Целью исследования является оценка профиля экспрессии микроРНК у пациентов с УМ и патогенными вариантами в генах GNAQ, GNA11, BAP1 и SF3B1.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужила информация из международной базы данных The Cancer Genome Atlas (диагноз УМ, проект TCGG-UVM). Для оценки профиля экспрессии микроРНК использованы данные 70 образцов опухолевой ткани УМ (хороидеи, хороидеи/цилиарного тела). В зависимости от выявленных генетических нарушений сформированы 5 подгрупп: GNA11-mut/BAP1-wt/SF3B1-wt n=21, GNAQ-mut/BAP1-wt/SF3B1-wt n=20, GNAQ-mut/BAP1-wt/SF3B1-mut n=10, BAP1-mut n=16 и SF3B1-mut n=13. В исследование включены пациенты с II-IV стадиями заболевания, которым выполнена энуклеация глаза. Медиана наблюдения составила 393 дня. Данные об уровне экспрессии микроРНК получены методом секвенирования нового поколения и измерены в количестве прочтений на миллион картированных чтений. Обработка данных — BCGSC miRNA Profiling. В качестве кандидата для сравнительного анализа отобраны микроРНК с высоким уровнем экспрессии в каждой подгруппе (медиана >10 000 прочтений/млн). Статистический анализ проведен с использованием критерия Манна-Уитни.

Результаты. Установлено, что профиль экспрессии BAP1-мутантных образцов меланомы глаза характеризуется гиперэкспрессией микроРНК hsa-let-7b и hsa-mir-103a/b в сравнении с другими подгруппами (p<0,05), а также ря-

дом отличий от SF3B1- и GNAQ-подгрупп: высокой экспрессией hsa-mir-99b и hsa-mir-143 (p<0,05) и низкой экспрессией hsa-mir-30a (p<0,01) и hsa-mir-181a-2 (p<0,01).

К специфическим особенностям SF3B1-мутантных УМ относится высокая экспрессия микроРНК hsa-mir-30a (p<0,05), hsa-mir-140 (p<0,01) и hsa-mir-181a-2 (p<0,01) в сравнении с BAP1- и GNA11-подгруппами, а также гиперэкспрессия hsa-mir-378a (p<0,05) в сравнении с BAP1-подгруппой и низкая экспрессия hsa-mir-22 (p<0,05) в сравнении с GNA11-мутантными образцами.

Несмотря на то, что GNAQ и GNA11 являются генами-паралогами, уровень экспрессии микроРНК hsa-mir-140 и hsa-mir-181a-2 был статистически значимо выше в GNAQ-подгруппе (p<0,05). Также стоит отметить различия в экспрессии микроРНК hsa-mir-30a и hsa-let-7b, однако без достоверных отличий. Наличие сопутствующих нарушений в гене SF3B1 у пациентов с мутациями в гене GNAQ приводило к статистически значимому повышению уровней экспрессии микроРНК hsa-mir-92a-1/2, hsa-mir-25 и hsa-mir-140 (p<0,05) и к снижению экспрессии hsa-mir-22 (p<0,05) и hsa-mir-103a-1/2 (p<0,01) в сравнении с GNAQ-mut/SF3B1-wt образцами.

При анализе выживаемости пациентов с III стадией заболевания (n=38; GNA11-mut/BAP1-wt/SF3B1-wt — 10, GNAQ-mut/BAP1-wt/SF3B1-wt — 8, BAP1-mut — 11, SF3B1-mut — 9) установлено, что пациенты SF3B1-подгруппы характеризовались лучшими показателями общей выживаемости в сравнении с BAP1- (p<0,05) и GNA11-подгруппами (p<0,01). Также в GNA11-подгруппе отмечена более высокая экспрессия hsa-mir-21 в образцах умерших пациентов в сравнении с выжившими на момент наблюдения (медиана 170059,5 против 67018,7 прочтений/млн; p<0,05).

Заключение. В результате исследования обнаружено, что профиль экспрессии микроРНК при УВ в GNAQ-mut подгруппе сопоставим с прогностически благоприятной SF3B1-mut подгруппой, а у пациентов с соматическими патогенными вариантами в гене GNA11 — с неблагоприятным BAP1-mut молекулярным подтипом опухоли. В качестве перспективных мишеней для дальнейшего изучения при данной локализации являются микроРНК hsa-let-7b, hsa-mir-30a и hsa-mir-103a-1/2, а также hsa-mir-21 в GNA11-подгруппе.

ВЛИЯНИЕ АБЕРРАНТНОГО CpG-МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ МИКРОРНК НА АЛЬТЕРАЦИЮ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК ПРИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОМ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

Пронина И.В.^{1,2}, Логинов В.И.¹, Бурденный А.М.¹, Лукина С.С.¹, Филиппова Е.А.¹, Казубская Т.П.³, Брага Э.А.¹

¹ ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, РФ;

² ФГБОУ высшего образования «Государственный университет просвещения», Москва, РФ;

³ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, РФ

Эпителиальный рак яичников, в частности, серозная аденокарцинома яичников, является заболеванием, обнаруживаемым, в основном, на поздних стадиях и тяжело поддающимся лечению. Исследование экспрессии и метилирования генов микроРНК может стать основой для разработки потенциальных новых диагностических и прогностических маркеров ЕОС, а также основой для разработки таргетной противораковой терапии.

Цель работы: определить частоту метилирования группы генов микроРНК при раке яичников и влияние метилирования на уровень экспрессии данных микроРНК для разработки потенциальных диагностических и прогностических биомаркеров рака яичников.

80 парных образцов серозной аденокарциномы яичников были получены из МНИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Экспрессию микроРНК оценивали методом обратной транскрипции с последующей количественной TaqMan-ПЦР с наборами компании Applied Biosystems, США. Анализ метилирования промоторных CpG-островков генов микроРНК осуществляли с помощью бисульфитной конверсии с последующей количественной метил-специфичной ПЦР.

Частота метилирования в опухоли была выше, чем в парной норме для десяти генов микроРНК (*MIR124-1*, *MIR124-2*, *MIR124-3*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR132*, *MIR137*, *MIR193A* и *MIR339*; $p \leq 5 \times 10^{-4}$). ROC-анализ показал, что комбинация четырех генов микроРНК (*MIR124-2*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*) может быть предложена в качестве панели маркеров обнаружения эпителиальной аденокарциномы яичников с чувствительностью (Sn) 80%, специфичностью (Sp) 82%, AUC=0,86. Комбинация генов микроРНК (*MIR193A*, *MIR129-2*, *MIR137*) характеризовалась

Sn=90%, Sp=75% и AUC=0,90. Для тех же десяти генов микроРНК частота метилирования в первичных опухолях с метастазами (33 парных образца) была выше, чем в первичных опухолях без метастазов (47 парных образцов). ROC-анализ отдельных генов микроРНК показал для *MIR124-2* Sn=74%, Sp=82%, AUC=0,78; для *MIR137* Sn=90%, Sp=76%, AUC=0,83; для комбинации *MIR203A* и *MIR375* Sn=90%, Sp=76%, AUC=0,86, что указывает на потенциальную возможность разработки панелей маркеров прогнозирования метастазирования при ЕОС на основе данных генов микроРНК.

Выявлена корреляция изменений экспрессии двенадцати микроРНК (*miR-124-3p*, *miR-125b-5p*, *miR-127-5p*, *miR-129-5p*, *miR-132-3p*, *miR-137*, *miR-148a-3p*, *miR-191-5p*, *miR-193a-5p*, *miR-203a*, *miR-339-3p* и *miR-375*) и изменений метилирования кодирующих их генов $rs=0,67-0,97$ (по Спирмену), $p \leq 10^{-4}$. Для пяти из двенадцати исследованных микроРНК наблюдалась высокая частота снижения экспрессии: *miR-125b-5p* — в 59% образцов, *miR-129-5p* — в 55%, *miR-132-3p* — в 55%, *miR-137* — в 52%, а *miR-193a-5p* — в 66% ($p \leq 0,05$).

Таким образом, выявлена роль метилирования в регуляции экспрессии двенадцати микроРНК и связь статуса метилирования десяти генов микроРНК с метастазированием эпителиальной аденокарциномы яичников. Пять микроРНК, гены которых оказались подавленными гиперметилированием, возможно, найдут применение в качестве потенциальных мишеней при заместительной терапии эпителиальной аденокарциномы яичников.

Ключевые слова: рак яичников, микроРНК, метилирование ДНК, CpG-метилирование.

СРАВНЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МУТАЦИОННЫХ СОБЫТИЙ У ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Рыболовлева Т.Н., Трегубова Е.В., Сарпова М.В., Назарова Е.Л., Фокина Е.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия

Введение. В последние годы у больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) выполняется широкий перечень генетических исследований. При первичной диагностике пациентов с ОМЛ большое значение имеет стратификация больных по группам риска, рекомендованная European Leukemia Net (ELN) в 2022 году. Распределение пациентов

с учетом прогноза заболевания основывается на цито- и молекулярно-генетических изменениях. Однако, несмотря на прогресс в генодиагностике ОМЛ, до сих пор остается открытым вопрос о влиянии мутаций на характер течения заболевания, а также закономерности ассоциаций точечных генетических aberrаций и хромосомных изменений.

Цель и задачи. Проанализировать частоту встречаемости различных цитогенетических аномалий и мутационных событий у больных ОМЛ. Оценить их ассоциацию для определения лечебной тактики.

Материалы и методы. В биобанке лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии ФГБУН КНИИ-ГиПК ФМБА России накоплен материал (образцы аспирата костного мозга, взятые в дебюте заболевания) 73 взрослых пациентов с впервые установленным диагнозом ОМЛ с 2020 по 2022 гг. В работе не учитывались больные ОМЛ, имеющие химерные онкогены *BCR::ABL1* и *PML::RARA*. Медиана возраста обследованных составила 63 (Q1-Q3: 54-68) года. Выделение геномной ДНК из образцов костного мозга выполнялось с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФГБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Мутации генов *FLT3* (ITD, TKD), *NPM1* и *CEBPA* исследовали методом фрагментного анализа, генов *NRAS* и *KRAS* — ПЦР с применением наборов реагентов «Real-time-PCR-NRAS-3R» и «Real-time-PCR-KRAS-7R» соответственно (ООО «БиоЛинк», Россия). Для определения мутационного статуса генов *ASXL1* и *TP53* использовали прямое секвенирование по Сэнгеру. Цитогенетический анализ выполняли методом G-дифференциального окрашивания хромосом, интерпретацию которого проводили в соответствии с Международной номенклатурой дифференциально сегментированных хромосом (ISCN, 2020). Статистическую обработку результатов исследования осуществляли в программе STADIA. Сравнение частоты встречаемости мутаций и цитогенетических нарушений оценивали с помощью критерия Пирсона или Фишера (при менее 5 событий).

Результаты. При цитогенетическом анализе нарушения кариотипа обнаружены у 37/73 (50,7 %) больных

ОМЛ. В группу неблагоприятного прогноза при наличии характерных хромосомных аномалий вошли 23/37 (62,2 %) наблюдаемых. Среди них комплексный или моносомальный кариотип выявлен у 15/23 (65,2 %) пациентов, нарушения 5, 7 и/или 17 хромосом в 4 (17,4 %) случаях, перестройки *KMT2A* (11q23) — в 2 (8,7 %), *t(6;9)(p23;q34.1)* — в 1 (4,3 %), *inv(3)(q21.3q26.2)* — в 1 (4,3 %). Группу благоприятного течения заболевания составили 7/37 (18,9 %) больных: аберрации *t(8;21)(q22;q22.1)* обнаружены у 4/7 (57,1 %), *inv(16)(p13.1q22)* или *t(16;16)(p13.1;q22)* — у 3 (42,9 %) пациентов. У 7/37 (18,9 %) обследованных выявлены изменения кариотипа, не влияющие на прогноз. Остальные пациенты (36/73, 49,3 %) имели нормальный кариотип.

При оценке молекулярно-генетических характеристик клеток опухолевого клона аберрации найдены в 36/73 (49,3 %) случаях. Мутации гена *FLT3* обнаружены у 17/73 (23,2 %) больных: *FLT3-ITD* у 9 (52,9 %), *FLT3-TKD* — у 7 (41,1 %), в 1 (5,9 %) случае присутствовали обе мутации. Мутации гена *NPM1* установлены у 9/60 (15,0 %), гена *TP53* — у 5/34 (14,7 %), гена *CEBPA* — у 5/40 (12,5 %), *ASXL1* — у 3/34 (8,8 %), *NRAS* — у 8/73 (10,9 %), *KRAS* — у 2/73 (2,7 %) наблюдаемых. Часть обследованных (14/36, 38,9 %) имела различные комбинации мутаций: *FLT3+/NPM1+* (5/14, 35,7 %), по одному случаю (1/14, 7,1 %) — *FLT3+/ASXL1+*; *FLT3+/TP53+*; *FLT3+/CEBPA+*; *FLT3+/NRAS+*; *KRAS+/NRAS+*; *NPM1+/KRAS+*; *NPM1+/NRAS+*; *TP53+/CEBPA+*.

При сопоставлении данных цитогенетического и молекулярно-генетического исследований 14/73 (19,2 %) больных одновременно характеризовались нарушением кариотипа и наличием мутаций. Распределение найденных аберраций представлено в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ОМЛ С НОРМАЛЬНЫМ КАРИОТИПОМ И ХРОМОСОМНЫМИ АНОМАЛИЯМИ

Мутированные гены		Количество пациентов с нормальным кариотипом		Количество пациентов с хромосомными аномалиями		p
		Абс.	%	Абс.	%	
FLT3	ITD	8	88,9	1	11,1	0,021
	TKD	3	42,9	4	57,1	0,555
	ITD + TKD	1	100,0	0	0	0,493
<i>NPM1</i>		8	88,9	1	11,1	0,010
<i>TP53</i>		0	0	5	100,0	0,044
<i>CEBPA</i>		1	20,0	4	80,0	0,342
<i>ASXL1</i>		2	66,7	1	33,3	0,601
<i>NRAS</i>		6	75,0	2	25,0	0,142
<i>KRAS</i>		2	100,0	0	0	0,226

Мутации генов *FLT3* ITD и *NPM1* ассоциированы с нормальным кариотипом ($p=0,021$ и $p=0,010$ соответственно). Аберра-

ции гена *TP53* связаны с различными прогностически неблагоприятными цитогенетическими перестройками ($p=0,044$).

Заключение. Различные нарушения кариотипа установлены у 50,7 % больных ОМЛ. Мутации генов *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *NRAS*, *KRAS*, *ASXL1* и *TP53* выявлены в 49,3 % случаях, из них в 38,9 % обнаружено сочетание аберраций в 2 генах. Одновременное наличие точечных замен и цитогенетических перестроек наблюда-

лось у 19,2 % пациентов. Выявлено, что мутации генов *FLT3* ITD и *NPM1* характерны для больных ОМЛ с нормальным кариотипом, *TP53* — с хромосомными нарушениями неблагоприятного течения заболевания, что позволяет персонализировать тактику противоопухолевой терапии.

ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2023 А.Н. Тороповский¹, А.Г. Никитин¹, О.Н. Павлова

¹ ООО «ТестГен», Ульяновск, Россия

² ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, Россия

Актуальность. Рак предстательной железы занимает второе место по летальности среди онкологических заболеваний. Такая картина обусловлена не только естественным ростом заболевания, но и расширением списка базовых методов диагностики. В данный момент к ним относятся — пальцевое ректальное исследование (ПРИ), определение в сыворотке крови уровня простатического специфического антигена (PSA), трансректальное ультразвуковое исследование (ТРУЗИ) с последующим выполнением биопсии предстательной железы (БПЖ).

Некоторое время наиболее точным показателем РПЖ считался уровень PSA, хотя это органоспецифический маркер и его повышение может сигнализировать о разнообразных заболеваниях предстательной железы. В настоящее время в клинической практике используется несколько форм PSA, каждой из которых отводят определённую роль в диагностике РПЖ: общий PSA (оPSA), свободный PSA (свPSA), связанный PSA.

При выявлении повышенного уровня PSA, данных пальцевого ректального исследования (ПРИ) и обнаружении гипоехогенных зон в ткани предстательной железы по данным ТРУЗИ применяется разработанная в 1989 г. Hodge К. мультифокальная биопсия предстательной железы под ультразвуковым контролем из 6 точек (так называемая «секстантная» биопсия) показывающая лучшие результаты выявляемости рака.

В настоящее время продолжается поиск наиболее эффективных методов диагностики РПЖ и базовые методики диагностики стали дополнять данными, получаемыми с помощью таких онкомаркеров, как ргоPSA (незрелая форма PSA или предшественник), PSCA (антиген простатических стволовых клеток), PSP 94 (секретируемый белок предстательной железы 94), ECPA и ECPA-2 (ранние антигены РПЖ), uPA/uPAR (рецепторы активатора плазминогена урокиназы), GSTP1 (глутатион-S-трансфераза P1), TMPRESS2:ERG (химерный белок, образующийся при хромосомной мутации со слиянием генов TMPRESS2 и ERG), PCA3 (специфический антиген рака ПЖ 3). Доказана роль ряда белков человеческого организма, таких как CD151, DIAPH3, Runx2 и многих других в ранней диагностике РПЖ, определении показаний к проведению повторной БПЖ и

риска развития агрессивного РПЖ. Также в диагностике РПЖ учитывается индекс здоровья простаты (PHI).

За последние 2 года с учетом вышеописанных маркеров РПЖ разработано и внедрено большое количество тест-систем, которые среди прочих включают 4K-тест (4Kscore), MiPS (Mi-Prostate Score), SChLAP1, SelectMDx, ConfirmMDx и ELAVL1 и др.

На основе PCA3 было разработано и валидизировано несколько номограмм и калькуляторов, включая PCPTRC 2.0 (Prostate Cancer Prevention Trial Risk Calculator).

Одним из наиболее достоверных методов ранней неинвазивной диагностики РПЖ в настоящее время является определение PCA3 (Prostate Cancer Antigene 3) — ген рака простаты 3.

По гистологическим данным PCA3 избыточно экспрессируется почти во всех образцах (95 %) ткани рака предстательной железы, но не в нормальной или гипертрофированной ткани. Уровень данного маркера определяется путем расчёта соотношения простатического специфического антигена 3 матричной РНК и простатического специфического антигена матричной РНК в анализе мочи, собранной после выполнения пальцевого ректального исследования или массажа простаты. Уровень экспрессии PCA3 в моче не зависит от локализации опухоли в предстательной железе и наличия хронического простатита.

Возможность использования оценки уровня PCA3 в моче впервые была предложена de Kok et al. в 2002 г. Метод заключается в исследовании PCA3 мРНК и PSA мРНК в моче, собранной у пациента после пальцевого ректального исследования. Предполагается, что оценка PCA3 в моче способна улучшить выявление РПЖ.

На данный момент PCA3 позиционируется как скрининговый тест первой линии, достоверно улучшающий выявление РПЖ, имеющий большую чувствительность и специфичность по сравнению с общим PSA.

Компанией «ТестГен» (Россия) разработан набор реагентов для выявления мРНК гена PCA3 и определения уровня его экспрессии методом двустадийной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) «Проста-Тест», предназначенный для професси-

онального применения в медицинских организациях и клинико-диагностических лабораториях онкологического и урологического профиля.

Данный набор реагентов выявляет отношение количества некодирующей мРНК гена PCA3 к уровню мРНК гена KLK3 методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией с гибридационно-флуоресцентной детекцией в пробе РНК человека, выделенной из образцов свежего или фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка, полученного центрифугированием или фильтрованием мочи, собранной после массажа простаты.

Цель: исследование эффективности набора реагентов для выявления мРНК гена PCA3 и определения уровня его экспрессии методом двустадийной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) «Проста-Тест».

Методы. На базе ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ» были проведены клинические испытания разработанного набора реагентов «Проста-Тест» производства ООО «ТестГен». В качестве объектов клинического испытания было использовано 50 образцов клеточного осадка, полученного центрифугированием мочи, собранной после массажа простаты, от пациентов-мужчин в возрасте от 40 лет с наличием показаний к биопсии предстательной железы. Ранее, с целью выполнения валидации функциональных характеристик, испытания набора реагентов были проведены на 200 образцах клеточного осадка мочи, в результате были определены диагностические показатели, аналогичные полученным в данном

исследовании. Таким образом, общий объем выборки составил 250 образцов.

После проведения процедуры отбора проб мочи, собранной после пальцевого ректального массажа предстательной железы, пациент в обычном порядке подвергнулся процедуре биопсии. Анализ и оценка результатов проведенных клинико-лабораторных испытаний разработанного набора реагентов подтвердили его качество, эффективность и безопасность применения. По результатам статистической обработки полученных характеристик эффективности с достоверной вероятностью 90 % диагностическая чувствительность исследуемого набора реагентов на образцах проб мРНК человека, выделенных из образцов свежего клеточного осадка составила 68,4 %, диагностическая специфичность — 73,1 %. Воспроизводимость результатов 100 %. В процессе испытаний набор реагентов «Проста-Тест» продемонстрировал высокую надежность.

Выводы. Таким образом, клинические исследования показали, что высокий уровень экспрессии PCA3 в моче пациента коррелирует с вероятностью обнаружения у него рака предстательной железы по результатам биопсии в большей степени, чем высокие значения PSA в крови. Значения позитивной и негативной прогностических ценностей теста на PCA3 выше, чем теста на PSA. Эти данные многократно подтверждены исследованиями, проведенными в разных клиниках. В связи с этим следует сделать однозначный вывод, что внедрение метода количественного определения PCA3 в клиническую практику может существенно повысить эффективность диагностирования рака предстательной железы и сократить количество ненужных биопсий.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ мРНК ГЕНА MGMT У ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ И ГЛИАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ЕГО ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ

Смирнов С.Ю.¹, Пашкевич А.М.¹, Гремза К.С.¹, Кундас Л.А.², Субоч Е.И.¹, Портянко А.С.¹

¹ РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

² Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Введение. Темозоломид является алкилирующим цитостатическим химиопрепаратом, одобренным для лечения пациентов с глиальными опухолями. Его эффективность при этом заболевании, в особенности в случае с глиобластомой, связана с метилированием промотора гена Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT). Несмотря на то, что данное генетическое нарушение обнаруживается примерно в 40% случаев колоректального рака (КРР), темозоломид продемонстрировал низкую эффективность в данной подгруппе пациентов (общая частота ответа < 10%). Исследователям из Национального института рака IRCCS (Милан, Италия) удалось значительно повысить данный показатель за счет сопутствующей иммуногистохимической оценки экспрессии белка MGMT на этапе определения потенциальной

чувствительности опухоли к терапии темозоломидом. Однако биологические процессы, определяющие эффективность темозоломида у пациентов с КРР все еще недостаточно изучены.

Цель. Установить связь метилирования промотора гена MGMT с уровнем экспрессии его мРНК в образцах опухолевой ткани кишечника и глиальных опухолей.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужила информация из международной базы данных The Cancer Genome Atlas. Для оценки статуса метилирования промотора гена MGMT использованы данные 242 образцов опухолевой ткани кишечника (TCGA-COAD) и 172 образцов глиальных опухолей (глиобластома n=62 TCGA-GBM, глиомы низкой степени злокачественности n=110 TCGA-LGG). Используемая панель для исследования — Infinium

HumanMethylation 450 BeadChip. Исследуемый CpG нуклеотид — cg12981137, входящий в область классического праймера для метилспецифичной ПЦР гена MGMT. Обработка данных — SeSAMe Methylation Beta Estimation. Пороговый уровень детекции метилированных нуклеотидов — $b > 0,3$. Данные об уровне экспрессии мРНК гена MGMT получены методом полного транскриптомного анализа (RNA-seq) с помощью секвенирования нового поколения и измерены в транскриптах на миллион прочтений. Обработка данных — STAR-Counts. Статистический анализ данных прове-

ден с использованием критерия Хи-квадрат и Манна-Уитни.

Результаты. Обнаружены достоверные различия ($p < 0,01$) в частоте метилирования CpG нуклеотида cg12981137 между глиомами низкой степени злокачественности (65,45%) и образцами KPP (33,47%), а также глиобластомами (37,01%). При этом, метилирование обоих аллелей гена MGMT ($b > 0,7$) обнаружено только в глиальных опухолях (6,45% глиобластом) и 9,09% глиом низкой степени злокачественности). Уровни экспрессии мРНК гена MGMT и представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК ГЕНА MGMT

Злокачественное новообразование	Уровень экспрессии мРНК (медиана; Q1-Q3)	
	Метилированный промотор гена MGMT	Не метилированный промотор гена MGMT
KPP	5,81; 1,48-8,85	16,95; 13,68-23,4
Глиобластома	2,46; 1,77-3,58	7,33; 5,42-8,77
Глиома низкой степени злокачественности	3,03; 2,05-4,99	5,11; 3,35-6,83

Выявлены статистически значимые различия в уровне экспрессии мРНК гена MGMT между пациентами с колоректальным раком и глиальными опухолями при неметилированном статусе нуклеотида cg12981137 ($p < 0,05$).

Заключение. В результате исследования установлено, что уровень экспрессии гена MGMT при отсутствии метилирования CpG нуклеотида cg12981137 в образцах KPP значительно выше, чем в глиальных опухолях. При этом у пациентов с KPP у которых выявлено метилирование промотора гена MGMT, уровень экспрессии его мРНК

в опухолевой ткани сопоставим с таковым в общей выборке глиобластом. Это может являться одной из основных причин низкой частоты ответа опухолей кишечника с метилированным промотором гена MGMT на терапию темозоломидом. Внедрение в клиническую практику дополнительных исследований, направленных на выявление образцов опухолевой ткани с низкой экспрессией мРНК/белка MGMT или ее отсутствием, может позволить повысить эффективность лечения пациентов с данным заболеванием.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *FOXP3* В ОПУХОЛЯХ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О.А. Коровин^{1,2}, Х. Ариуа³, А.В. Алясова², Н.В. Красногорова^{1,3}, Д.В. Новиков⁴, В.В. Новико^{3,4}

¹ ГБУЗНО «Городская больница №33»

² ФГБУ ВПО «Приволжский исследовательский медицинский университет»

³ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

⁴ ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной

Введение. Ген *FOXP3* кодирует белок, принадлежащий к транскрипционным факторам семейства fork-head/winged-helix и экспрессируется в регуляторных Т-лимфоцитах, в том числе в опухоль-инфильтрирующих регуляторных Т-лимфоцитах. Обнаружение различного уровня белка *FOXP3* при раке предстательной железы указывает на то, что его роль может быть более важной и сложной, чем считалось изначально.

Целью работы явилось исследование экспрессии гена *FOXP3* в опухолях пациентов с раком предстательной железы (РПЖ) с различными клиническими признаками заболевания.

Материалы и методы. В работе использовали образцы опухолей от 59 пациентов с РПЖ. Определение уровня мРНК исследуемого гена выполняли методом ОТ-

ПЦР с детекцией в реальном времени с использованием специфичных праймеров. Уровни мРНК рассчитывали по формуле $\Delta\Delta Ct$ с учетом эффективности реакции. Нормировку проводили относительно мРНК убиквитина С (*UBC*). Статистическую обработку данных проводили, используя U-критерий Манна-Уитни и H-критерий Краскела-Уоллиса.

Результаты. Установлено, что уровень мРНК *FOXP3* в опухолях пациентов с РПЖ детектировался не во всех исследуемых образцах. Частота обнаружения составила 72,88% (43 из 59 образцов). У пациентов с наибольшим объемом опухоли обнаруживался самый низкий уровень мРНК *FOXP3*. С уменьшением объема опухоли уровень мРНК увеличивался в 2,66 раза ($p = 0,008$). Также отмечено, что у пациентов с поражением регионарных лимфоузлов

уровень мРНК *FOXP3* статистически значимо снижался в 3,17 раза ($p=0,032$) по сравнению с пациентами без поражения лимфоузлов. При сравнении уровня мРНК *FOXP3* у пациентов разного возраста, с разным видом выполненной хирургической операции, количеством очагов в железе, разным коэффициентом жесткости опухоли, уровнем простат-специфического антигена, стадии заболевания, размером опухоли, а также при сравнении уровней мРНК

в биоптате по шкале Глисона статистически значимых различий не выявлено.

Выводы. Таким образом, прогрессирование опухолевого роста у пациентов с РПЖ сопровождается падением изначально высокого уровня экспрессии гена *FOXP3*, что свидетельствует о том, что он проявляет наибольшую опухоль-супрессорную активность на ранних стадиях развития опухоли.

МЕТАБОЛОМНЫЕ И ТРАНСКРИПТОМНЫЕ МАРКЕРЫ СЕРОЗНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКОВ

Кутилин Д.С., Гуськова О.Н.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Россия

Актуальность: В молекулярной онкологии скрининг генетических и транскриптомных маркеров рака яичников (РЯ) долгие годы являлся актуальным направлением. Были достигнуты определенные успехи в выявлении дифференциально экспрессирующихся генов и микроРНК с потенциалом для диагностики опухолей яичника. Но не один из подобных маркеров так и не вошел в клиническую практику. Ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия (УВЭЖХ-МС) позволяет получить информацию обо всех низкомолекулярных метаболитах в биологических жидкостях больных РЯ, которые могут стать потенциальными маркерами заболевания. УВЭЖХ-МС имеет ограниченное распространение в учреждениях здравоохранения, соответственно, необходим переход от результатов метаболомного профилирования к более доступными диагностическим методам.

Целью исследования стало выявление новых малоинвазивных молекулярных маркеров РЯ с использованием метаболомного и транскриптомного профилирования мочи.

Материалы и методы: Проспективное исследование выполнено на 150 пациентах с серозной аденокарциномой яичников и 50 условно здоровых индивидуумах (контрольная группа). Для анализа собиралась первая утренняя моча, которая обрабатывалась по стандартному протоколу для метаболомного анализа. Разделение метаболитов проводили на хроматографе Vanquish Flex UHPLC System, сопряженном с масс-спектрометром Orbitrap Exploris 480. Идентификацию метаболитов проводили в ПО Compound Discoverer Software. Поиск генов-регуляторов метаболитов и микроРНК регуляторов генов осуществляли с использованием метода машинного обучения «Random Forest». РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Транскрипты микроРНК в моче определяли методом ПЦР-РВ. Для оценки различий использовали критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на множественное сравнение. Для выбора минимальных наборов микроРНК и построения предсказательных моделей использовали LASSO-пенализованную логистическую регрессию. Операции проводили при помощи языка программирования R и Python.

Результаты: Методом УВЭЖХ-МС в моче обследуемых было идентифицировано 438 метаболитов. У больных РЯ 26 соединений имели аномальную концентрацию по сравнению с контрольной группой ($p<0.0001$): кинуренин, фенилаланил-валин, лизофосфатидилхолин (18:3), лизофосфатидилхолин (18:2), аланил-лейцин, лизофосфатидилхолин (20:4), L-фенилаланин, фосфатидилинозитол (34:1), 5-метокситриптофан, 2-гидроксимиристиновая кислота, 3-оксохоловая кислота, лизофосфатидилхолин (14:0), индолакриловая кислота, лизоосфатидилсерин (20:4), L-бета-аспартил-L-фенилаланин, миристиновая кислота, деканоилкарнитин, аспартил-глицин, малонилкарнитин, 3-гидроксибутирилкарнитин, 3-метилксантин, 2,6 диметилгептаноилкарнитин, 3-оксодекановая кислота, N-ацетилпролин, L-октаноилкарнитин, каприлоилглицин). Методом машинного обучения «Random forest» были установлены взаимосвязи метаболит-ген регулятор-микроРНК регулятор (602 микроРНК). Выявленные микроРНК были валидированы методом ПЦР-РВ. Обнаружены статистически значимые ($p<0.005$) изменения уровня 47 микроРНК относительно условно-здоровых индивидуумов. Формирование диагностической панели маркеров серозной аденокарциномы яичника осуществляли на основе 1081-ти пары микроРНК (попарное объединение 47 микро-РНК дает 1081 их комбинацию, $C(47, 2)! = 2.586232e+59 / (2 * 1.196222e+56) = 1081$), уровень транскриптов которых значимо и стабильно отличалась между больными и условно-здоровыми людьми. С использованием LASSO-пенализованной логистической регрессии оптимизированной при помощи «bootstrap» наборов данных получена финальная панель микроРНК: hsa-miR-4668-3p/hsa-miR-423-5p, hsa-miR-30c-5p/hsa-miR-6743-5p, hsa-miR-423-5p/hsa-miR-6743-5p, hsa-miR-4742-5p/hsa-miR-1207-5p и hsa-miR-4668-3p/hsa-miR-17-5p, сочетание которых обеспечивает диагностическую чувствительность на уровне 95%, а специфичность на уровне 93% при разделении обследуемых на группу больных РЯ и условно-здоровых.

Выводы. Исследование мочи больных РЯ с помощью генетических и масс-спектрометрических подхо-

дов выявило метаболомный дисбаланс жирных кислот, ацилкарнитинов, фосфолипидов, аминокислот, производных азотистых оснований и аномальный уровень 47 микроРНК. При этом метаболиты кинуренин, фенилаланил-валин, лизофосфатидилхолины, аланил-лейцин, L-фенилаланин, фосфатидилинозитол, 5-метокситриптофан, 2-гидроксимиристиновая кислота, 3-оксохолевая кислота, индолакриловая кислота, лизоосфатидилсерин, L-бета-аспартил-L-фенилаланин, миристиновая кислота,

деканойлкарнитин, аспартил-глицин, малонилкарнитин, 3-гидроксibuтирилкарнитин, 3-метилксантин, 2,6 диметилгептаноилкарнитин, 3-оксодекановая кислота, N-ацетилпролин, L-октаноилкарнитин и каприлоилглицин, а также микроРНК hsa-miR-4668-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-6743-5p, hsa-miR-4742-5p, hsa-miR-1207-5p и hsa-miR-17-5p в попарном сочетании имеют потенциал в качестве малоинвазивных маркеров серозной аденокарциномы яичников.

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА TPMT У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Силин А.Е., Ромашевская И.П., Мартинков В.Н.

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь

Введение. Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) является самой большой группой лейкозов у детей и составляет 70–80% от всех. Смертность от лейкозов является лидирующей в структуре смертности от злокачественных новообразований в детском возрасте.

В протоколы лечения ОЛЛ входят различные цитотоксические препараты.

6-меркаптопурин (6-МП) является одним из основных препаратов, применяемых в лечении детей с ОЛЛ. 6-МП является пролекарством. Его активные метаболиты — тиогуаниновые основания — убивают активно делящиеся клетки, ингибируя синтез РНК и ДНК. В метаболизации 6-МП принимает участие фермент тиопуридин-5-метилтрансфераза (TPMT). Под действием TPMT из 6-МП образуется 6-метилМП — неактивный продукт. Эта реакция в норме препятствует образованию большого количества тиогуаниновых оснований. В то же время некоторые пациенты, получая стандартные дозы тиопуриновых препаратов, накапливают высокие уровни ТГ нуклеотидов, что обычно приводит к тяжелым побочным эффектам, например, миелосупрессии. Это является следствием сниженной активности фермента TPMT, что, в свою очередь, может быть обусловлено наличием различных генетических вариантов гена, кодирующего TPMT.

Ген TPMT обладает значительным генетическим полиморфизмом. В настоящее время известны более 20 генетических вариантов TPMT, которые могут быть связаны со снижением уровня активности фермента. Эти полиморфизмы в основном представляют собой однонуклеотидные замены (SNP) в различных частях гена TPMT. Среди них наиболее распространенными являются с.238G>C, с.460G>A и с.719A>G. Есть аллели TPMT, содержащие один или несколько SNP. В результате проведенных популяционных исследований установлено, что 95% всех клинически значимых вариантов TPMT приходится на долю только трех аллелей, обозначенных как TPMT*3A, TPMT*3C и TPMT*2. Последний из них вносит наименьший вклад. Диккий тип (норма) обозначается как TPMT*1. Аллель TPMT*2 содержит одиночный полиморфизм с.238G>C, аллель

TPMT*3A имеет два полиморфизма с.460G>A и с.719A>G, а TPMT*3C имеет только полиморфизм с.719A>G.

Важно отметить, что распределение клинически значимых аллелей является популяционно-специфическим. Аллель TPMT*3A является наиболее распространенным вариантом у европеоидов (частота примерно 5%), в то время как TPMT*3C преобладает у лиц с азиатским или африканским происхождением (частоты 0,3–3% и 5,5–7,6% соответственно).

Таким образом, в процессе лечения ОЛЛ для своевременного определения баланса терапевтического и токсического действия дозы препарата 6-МП необходимо проведение генотипирования TPMT, которое должно быть организовано с учетом популяционных особенностей распространения генетических вариантов TPMT.

Цель. Определить частоту встречаемости вариантов гена TPMT у детей с острым лимфобластным лейкозом, проживающих в Гомельской области.

Материалы и методы. В исследование были включены 66 детей с ОЛЛ, проходивших лечение в ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» г. Гомеля. Возраст пациентов варьировал от 0 до 16 лет (медиана составила 3 года), мальчиков было 41, девочек — 25. Пациенты находились на стационарном лечении в онкологическом гематологическом отделении для детей и получали лечение по клиническому протоколу ALL-MB, утвержденному Министерством здравоохранения Республики Беларусь. Всем пациентам был установлен диагноз ОЛЛ на основании морфологического и иммунологического исследования костного мозга.

Материалом для молекулярно-генетического исследования являлись образцы ДНК, выделенные из цельной венозной крови посредством набора «ДНК-Сорб-В» (Амплисенс, РФ) в соответствии с прилагаемой инструкцией по применению. Генетические полиморфизмы с.238G>C, с.460G>A и с.719A>G анализировали методом ARMS-PCR, применяя 13 различных олигонуклеотидных праймеров (Праймтех, РБ), как описано в работе Roberts с соавторами (Roberts et al., 2004). Детекция результатов ПЦР осуществ-

влялась при помощи 1,7% агарозного гель-электрофореза с окраской бромистым этидием и последующей визуализацией и фотофиксацией в гель-документирующей системе ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

Основные результаты. В результате проведенного молекулярно-генетического анализа образцов ДНК от 66 пациентов с ОЛЛ выявлено 5 случаев присутствия в генотипе клинически значимых генетических полиморфизмов. В четырех случаях у пациентов выявлялись совместно полиморфизмы с.460G>A и с.719A>G, что соответствует варианту аллеля TPMT*3A. Во всех четырех случаях аллель TPMT*3A присутствовал в гетерозиготном состоянии в составе генотипа TPMT*1/*3A. В подгруппе пациентов с гетерозиготным носительством TPMT*3A присутствовали 3 пациента мужского пола в возрасте 1, 6, и 15 лет и один пациент женского пола в возрасте 3 года. В одном случае у девочки (возраст 5 лет) выявлен генетический полиморфизм с.719A>G. Индивидуальное присутствие данного полиморфизма в генотипе соответствует аллелю TPMT*3C. Данный аллель присутствовал у пациента в гетерозиготном состоянии в составе генотипа TPMT*1/*3C.

Частота носительства генотипа с участием аллеля TPMT*3A в обследованной группе равнялась $6,1 \pm 2,9\%$, что соответствует частоте распространенности данного

генотипа в европейских популяциях, где она варьирует от 3,2% до 5,7%. Генотип с участием аллеля TPMT*3C выявлен в нашем исследовании с частотой $1,5 \pm 1,5\%$, что незначительно отличается от установленной частоты в европейских популяциях (0,3–1,0%). Среди 66 исследованных пациентов с ОЛЛ не было выявлено ни одного случая присутствия в генотипе аллеля TPMT*2, который характеризуется наличием одиночного генетического полиморфизма с.238G>C. В исследованных европейских популяциях данный генотип выявлялся в пределах 0,2–0,8% случаев. Таким образом, отсутствие TPMT*2 в нашей группе исследования может быть связано с относительно небольшой выборкой исследованных случаев.

Заключение. Проведенный молекулярно-генетический анализ группы пациентов с ОЛЛ из Гомельской области установил, что наиболее распространенным в данном регионе вариантом генетического полиморфизма TPMT, влияющим на метаболизм 6-МП, является аллель TPMT*3A, присутствующий в $6,1 \pm 2,9\%$ случаев. Вариант гена TPMT*3C выявлен у $1,5 \pm 1,5\%$ пациентов. Все случаи клинически значимых вариантов были представлены в гетерозиготном состоянии. Вариант гена TPMT*2 в нашем исследовании не выявлен, что свидетельствует о его крайне редкой встречаемости.

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE EXPRESSION OF ICAM-1 MOLECULE AND COLORECTAL TUMOR CELLS

Mokrane A.^{1,2}

¹ Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

² University of Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algeria.

Introduction. Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1, or CD54) is a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily and is found at basal levels in a wide variety of cell types and upregulated in response to a number of inflammatory mediators. During an inflammatory process, ICAM-1 is expressed on the surface of endothelial cells and plays an essential role in mediating the firm adhesion of leukocytes. ICAM-1 also plays a crucial role in several malignant tumors, including breast, gastric and colorectal cancer, the increased expression of ICAM-1 in cancer cells has been correlated with a more interesting prognosis, suggesting a role of ICAM-1 in the immune surveillance increase.

Research objective. The aim of this research is to study the level expression of ICAM-1 molecule in blood and tumor cells of patients with colorectal cancer.

Material and methods. We analyzed 56 samples of peripheral blood of patients with colorectal cancer and 56 samples of tumor nodes of patients with colorectal cancer, provided the Nizhny Novgorod State Medical Academy. RT-PCR and Real time PCR were released using primers to detect mRNA ICAM-1 gene. We used the GraphPad Prism 5 computer program to compare between two types of samples. To compare the two independent groups by quantitative

characteristics, a two-sided U- Mann-Whitney test. Differences were considered statistically significant at a level of $p < 0,05$.

Results. Samples of peripheral blood and tumor nodes of colorectal patients living in Nizhny Novgorod show a difference between two types of our samples. mRNA level expression of ICAM-1 gene was increased in tumor nodes comparing by mRNA level expression of ICAM-1 gene in peripheral blood.

Conclusion. This study shows that, alongside its role of immune surveillance, ICAM-1 affects the cell biological behavior of colorectal cells. This molecule plays an important role in the diagnosis of patients with colorectal cancer.

References

Benedicto A, Romayor I, Arteta B. Role of liver ICAM-1 in metastasis. *Oncol Lett.* 2017 Oct; 14(4): 3883–3892.

Bui TM, Wiesolek HL, Sumagin R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol.* 2020 Sep; 108(3): 787–799.

Figenschau SL, Knutsen E, Urbarova I, Fenton C, Elston B, Perander M, Mortensen ES, Fenton KA. ICAM1 expression is induced by proinflammatory cytokines and associated with TLS formation in aggressive breast cancer subtypes. *Sci Rep.* 2018; 8: 11720.

АНАЛИЗ МЕТИЛОМА РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНОЙ ГИПЕРПЛАЗИИ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ

Пономарева А.А.¹, Щеголева А.А.^{1,2}, Гервас П.А.¹, Геращенко Т.С.¹, Панкова О.В.¹, Зарубин А.А.³, Перельмутер В.М.¹, Чердынцева Н.В.¹, Денисов Е.В.¹

¹ НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН,

² Томский государственный университет,

³ НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН, Томск

Актуальность. Плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ) возникает в результате прогрессивно развивающихся на фоне хронического воспаления морфологических изменений эпителия бронхов: базальноклеточной гиперплазии (БКГ), плоскоклеточной метаплазии (ПМ) и дисплазии (Д). В литературе представлены данные о том, что встречаются разные варианты сочетаний предопухолевых изменений бронхиального эпителия: изолированная БКГ (ИБКГ), комбинации БКГ с ПМ (БКГПМ) и ПМ с дисплазией (ПМд). Метилирование ДНК является одним из ранних событий малигнизации. Идентификация молекулярных сигнатур предопухолевых изменений имеет фундаментальную значимость и расширяет представления о патогенезе рака легкого, открывает возможности для идентификации маркеров прогноза. Целью настоящей работы явилось изучение профиля метилирования ДНК различных предопухолевых изменений бронхиального эпителия с целью выявления дифференциально-метилированных регионов (ДМР) на ранних этапах предопухолевого процесса.

Материалы и методы. С помощью лазерной микродиссекции (PALM, Carl Zeiss) получали образцы БКГ и нормальной ткани бронхиального эпителия (на расстоянии 5 см от опухолевого очага) от больных с диагнозом ПКРЛ (n=8). Для приготовления ДНК-библиотек с целью последующего полногеномного бисульфитного секвенирова-

ния использовали набор Pico Methyl-Seq Library Prep Kit (ZymoResearch, США). Секвенирование проводили на платформе HiSeq X (Illumina, США).

Результаты. В настоящем пилотном исследовании проведен анализ метилома двух форм БКГ бронхиального эпителия (ИБКГ и БКГ+пм+). При ИБКГ выявлены ДМР в интронной области генов, вовлеченных в связывание молекул АТФ, нуклеиновых кислот и белков (FDR ≤ 0,05). При БКГ+пм+ ДМР определены в интронной области генов, вовлеченных в регуляцию фосфатазной активности (*PHACTR1*, *PHACTR3*, *PPP1R2B*, *PPP1R2C*, *PPP1R3B*, *PTN*, *SBF2*, *CDC25B*, *CPPED1*, *PDPR*, *PPM1H*, *PTPRS*, *PTPRN2*, *DUSP22*) и генов, вовлеченных в AMPK (*CREB3L1*, *CREB3L3*, *CREB5*, *IRS2*, *PDK1*, *PPP2R2B*, *PPP2R2C*, *PPP2R3B*, *RPTOR*) и PI3K-Akt сигнальные пути (*CREB3L1*, *CREB3L3*, *CREB5*, *GRB2*, *PDK1*, *PPP2R2B*, *PPP2R2C*, *PPP2R3B*, *PRKCA*, *COL6A3*) (FDR ≤ 0,05). Также были выявлены ДМР в области генов микроРНК: miR-34a и miR-3648 в ИБКГ, а miR-924 и miR-100 в БКГ+пм+.

Выводы. Результаты настоящего исследования указывают на различия метилома различных форм БКГ. Обнаруженные ДМР представляют большой интерес как потенциальные триггеры прогрессии БКГ в плоскоклеточную метаплазию, дисплазию и далее в рак.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-29-06002.

ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ RASSF1 И MGMT КАК МАРКЕР НЕСЕМИНОМНЫХ ГЕРМИНОКЛЕТОЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Горбач Е.И., Романцова А.С., Кофанов Е.Л., Пахомова И.В.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Беларусь

Ключевые слова: Аберрантное метилирование, герминоклеточные опухоли, альфа-фетопротеин.

Актуальность исследования: Герминоклеточные опухоли яичка (ГКО) представляют собой группу гетерогенных, биологически разнообразных и клинически сложных новообразований. Но, не смотря на это, большинство из них имеют общий онкогенный путь и цитогенетический фон, поэтому именно эпигенетические изменения могут являться причиной их фенотипического и клинического разнообразия, что может быть использовано в качестве диагностических и прогностических биомаркеров.

Цель исследования: Выявить наличие взаимосвязи паттерна аберрантного метилирования дистальных промоторов генов-онкосупрессоров (RASSF1, MGMT, HIC1, BRCA1 и APC) с гистологическим типом и с наиболее значимыми клиническими характеристиками (возраст манифестации, стадия, уровень экспрессии АФП и ХГЧ) герминоклеточных опухолей яичка.

Материалы и методы: Были исследованы образцы ДНК, полученные из биопсийного материала 22 взрослых пациентов с гистологически верифицированным диагнозом ГКО яичка. Бисульфитную конверсию проводили набором EpiJetBisulfiteConversionKit (Thermoscientific, Литва). С

помощью онлайн-сервиса MethPrimer осуществлялся подбор праймеров для метил-специфичной ПЦР фрагментов дистальных промоторов генов RASSF1, MGMT, HIC1, BRCA1 и APC. Визуализацию результатов ПЦР осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов Excel (2016) и Statistica 8.0 (Dell, США).

Результаты: Наличие гиперметилирования промоторных областей хотя бы одного из исследуемых генов было детектировано для 10 пациентов исследуемой группы (45,5% случаев). Метилирование промотора гена RASSF1 выявлено в 8 из 22 образцов (36,4% случаев), гена MGMT — в 5 из 22 (22,7%), гена HIC1 — 5 из 20 образцов (25%), гена BRCA1 — 3 из 22 образцов (13,6%), гена APC — в 2 из 22 образцов (9,1%). Установлено, что ГКО с несеминомным компонентом (n=9) ассоциированы с гиперметилированием генов MGMT (p = 0,043) и RASSF1 (p = 0,002). Кроме того, aberrантное метилирование гена RASSF1 достоверно связано с высокими показателями АФП в периферической крови пациентов с ГКО (p = 0,008), ассоциированными с неблагоприятным прогнозом при данной группе злокачественных новообразований.

Выводы: На основании полученных результатов, можно предположить, что изменение паттернов метили-

рования промоторных регионов генов RASSF1 и MGMT может иметь решающую роль в формировании опухолевого фенотипа при несеминомах и смешанных ГКО, а определение статуса метилирования указанных генов может быть использовано в качестве дополнительного диагностического теста при гистологическом типировании ГКО. Наличие взаимосвязи между гиперметилированием гена RASSF1 и высоким уровнем АФП в периферической крови пациентов с ГКО может указывать на неблагоприятное прогностическое значение выявленного биологического маркера, однако это требует проведения дополнительных исследований, путем увеличения количества исследуемых образцов.

Литература:

1. The epigenetics of testicular germ cell tumors: looking for novel disease biomarkers / A. L. Costa [et al.] // Epigenomics. — 2016. — Vol. 9, n. 2. — P. 15.
2. MGMT status as a clinical biomarker in glioblastoma / M. Butler [et al.] // Trends Cancer. Author manuscript. — 2021. — P. 20.
3. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours / H. Moch [et al.] // European urology. — 2016. № 70 — P. 93–105.

МОДЕЛЬ ОБНАРУЖЕНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛЕВОЙ ДНК В ПЛАЗМЕ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL6 КАК СИНГЕННОЙ МОДЕЛИ МЕЛАНОМЫ B16F10

Коноплина К.М., Мальченкова А.А., Калинина Н.А., Пинюгина М.В., Кособокова Е.Н.

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия,

Введение. Использование инструментов «жидкостной биопсии» для детекции онкомаркеров все больше привлекает внимание исследователей в связи с меньшей травматичностью для пациентов. С развитием методов цифровой ПЦР стало возможным сколько-нибудь надежно выявлять специфические для опухоли генетические изменения в пуле циркулирующей в плазме крови ДНК (цДНК). Для разработки таких диагностических методов на доклиническом этапе используются лабораторные модели мелких грызунов: ксенографтные и генно-инженерные мышинные модели опухолей. Однако потенциал использования сингенной мышинной опухолевой модели в таких исследованиях как модели, более простой в получении и воспроизводящей взаимодействия между иммунной системой и опухолью, остается неясным.

Цель. Разработка методики оценки уровня детектируемой циркулирующей опухолевой ДНК в плазме мышей линии C57Bl6 как сингенной модели меланомы B16F10.

Задачи исследования:

1. наращивание клеточной линии мышинной меланомы B16F10; получение сингенной модели меланомы на мышах линии C57Bl6;
2. проведение регулярного забора крови и измерения опухоли в течение 3-х недель; выделение геномной

ДНК из нормальной и опухолевой ткани, выделение цДНК из плазмы крови;

3. дизайн пары праймеров и зондов, плазмиды с мутацией; подбор и оптимизация условий амплификации для цифровой ПЦР; оценка параметров цифровой ПЦР: линейность, специфичность, чувствительность, точность;

4. исследование цДНК, выделенной из плазмы мышей, на предмет присутствия опухолевой ДНК при помощи цифровой ПЦР.

Материалы и методы. Перед экспериментом клеточную линию мышинной меланомы B16F10 проверяли на контаминацию микоплазмой (MycroReport, Евроген). Для введения мышам готовили суспензию с концентрацией 2 млн клеток в 1,0 мл среды 199 без добавок (ПанЭко, Россия).

В эксперименте использовали мышей линии C57Bl6, самок возрастом 6-7 недель, весом 20-26 г из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Опыты, проводимые на животных, были выполнены в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей от 1986 г. Протоколы опытов были утверждены на заседании локального этического комитета НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. В исследо-

вании было 2 группы: 4 контрольных животных (вводили подкожно в правый бок по 0,5 мл среды 199), 10 опытных (вводили подкожно в правый бок 1 млн опухолевых клеток в 0,5 мл среды 199). Забор крови осуществляли из ретро-орбитального синуса через день, на 7, 14 и 21 дни после перевивки опухоли.

Из образцов плазмы выделяли цДНК (PME free-circulating DNA Kit, Analytik Jena), из опухолевого материала и кожи выделяли геномную ДНК (DNeasy Blood & Tissue, Qiagen).

Для детекции опухолевой цДНК использовали набор праймеров и TaqMan-зондов, специфичных для варианта chr7:109894747T>G в гене *Dennd5a*, ранее выявленного в качестве соматической мутации, возникающей в сингенной модели мышинной меланомы V16F10, и подтвержденного секвенированием по методу Сэнгера. Для синтеза праймеров и TaqMan-зондов использовали последовательности: прямой праймер 5'-TCAGAGGTCAGATGTCAATG-3'; обратный праймер 5'-GCCTGTCTTTCTTTTCCC-3'; TaqMan-зонд на референсную последовательность 5'-HEX-ACATGTATGAGGACGTGGCGCTG-BHQ1-3'; TaqMan-зонд на мутантную последовательность 5'-FAM-ACATGTATGAGGCCGTGGCGCTG-BHQ1-3'.

Цифровую капельную ПЦР проводили на платформе QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad). Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 1x смесь ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (Bio-Rad), 0,8 мкМ смеси праймеров, 0,4 мкМ каждого TaqMan-зонда и 1-8,3 мкл геномной либо циркулирующей ДНК либо смеси геномной и плазмидной ДНК (см. ниже).

Для подбора оптимальной температуры отжига праймеров и TaqMan-зондов проводили цифровую ПЦР с геномной ДНК опухолевого материала и нормальной ткани (кожи) в температурном градиенте при условиях амплификации: 95°C, 10 мин; 40 циклов 94°C 30 с — градиент 52°C — 62°C, 1 мин; 98°C, 10 мин. Температура отжига, при которой наблюдалось максимальное расстояние между кластерами капель при наименьшем количестве неспецифичных капель, составила 60,1°C и использовалась в последующих экспериментах.

Анализ линейности аналитического сигнала, эмпирическое определение чувствительности (предела обнаружения), оценку точности (повторяемости, промежуточной прецизионности) проводили с помощью серии разведений плазмиды, содержащей последовательность гена *Dennd5a* с мутацией, на фоне 5 нг геномной ДНК нормальной мышинной ткани.

При количественном определении цДНК в экспериментальных образцах использовали контроли: без матрицы (вода без нуклеаз), положительный (смесь плазмиды с мутацией и геномной ДНК нормальной ткани), отрицательный (геномная ДНК нормальной ткани). Анализ полученных капель проводили с помощью программного обеспечения QuantaSoft 1.7.4. Количество копий цДНК с мутацией, суммарно содержащееся в элюате, нормировали на объем плазмы, из которого была выделена цДНК. Для анализа различий между средними значениями уровня мутантной цДНК в контрольной и экспериментальной группах использовали двусторонний непарный t-тест ($\alpha = 0,05$).

Результаты. Разработана методика количественного определения циркулирующей опухолевой ДНК в сингенной модели меланомы V16F10 у мышей линии C57Bl6. Аналитический сигнал линейен в диапазоне 0,5 — 32 копии/мкл, значение R^2 составило 0,997. Эмпирический предел обнаружения опухолевой цДНК составил 1 копию/мкл в присутствии 5 нг геномной ДНК нормальной ткани. Значения коэффициента вариации состояли в диапазоне от 44,5% (для 1 копии/мкл) до 16,6% (16 копий/мкл).

Опухолевая цДНК в сингенной модели меланомы V16F10 у мышей линии C57Bl6 достоверно детектируется на 21 день после перевивки опухолевых клеток ($p = 0,027$). Уровень опухолевой цДНК коррелирует с объемом опухоли ($r = 0,99$).

Заключение. Разработанная методика позволяет выявить цДНК опухолевых клеток линии V16F10 у мышей линии C57Bl6 и может использоваться для изучения возможностей мониторинга динамики роста и гетерогенности опухоли на фоне терапии, молекулярно-генетического анализа труднодоступных очагов, детекции рецидивов и остаточной опухоли после операции.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА В ТОЛСТОЙ КИШКЕ НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ МРНК ГЕНОВ

Захаренко М.В., Боженко В.К., Кулинич Т.М., Гончаров С.В., Гончарова О.И., Кудинова Е.А., Солодкий В.А.

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ), Москва, Россия

Введение: Колоректальный рак (КРР) является серьезной медицинской и социально-экономической проблемой, это одна из наиболее распространенных нозологических форм в структуре онкологических заболеваний во всем мире, для которой характерна высокая смертность и низкий уровень 5-и летней выживаемости,

не превышающий 50%. Во многом это обусловлено поздним выявлением заболевания. Поиск, разработка и внедрение новых молекулярно-генетических методов диагностики КРР является чрезвычайно актуальной задачей.

Цель исследования: разработка метода диагностики патологического процесса в толстой кишке на основе

молекулярно-генетического анализа морфологически неизмененного кишечного эпителия, отдаленного от очага опухолевого поражения.

Материалы и методы: Проведено исследование 178 образцов цитологического материала, полученного из морфологически неизмененного кишечного эпителия прямой кишки. Забор клеточного материала осуществляли с помощью уrogenитального зонда тип D «Цитощетка», который сразу помещали в раствор солей, стабилизирующий мРНК Ever Fresh RNA (Sileks, Россия). Клинический материал получен от пациентов с КРР (n=44), аденоматозными, гиперпластическими полипами толстой кишки (n=18) неспецифическим язвенным колитом (n=55). На основании типа патологии были сформированы 4 группы образцов. В контрольную группу «Норма» вошли условно здоровые лица (n=61) без патологии в толстой кишке. На этапе выделения мРНК из образцов тканей толстой кишки использовались коммерческие наборы колонок RNeasy mini Kit (Qiagen, Германия). Для определения экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени использовали набор из 62 ген-специфичных зондов и пар праймеров, разработанный «НПФ ДНК-Технология». Экспрессию мРНК измеряли в условных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов (Cp) функциональных генов, относительно референсных генов. Статистическая обработка проведена с использованием программы «STATISTICA-10» (StatSoft, США).

Основные результаты: В исследовании была оценена возможность применения метода дискриминантного анализа для дифференцировки патологии в толстом

кишечнике по материалу мазков из прямой кишки. Основанием послужила гипотеза, что при возникновении патологии в толстой кишке, молекулярно-генетические изменения могут затрагивать весь пораженный орган. Для построения модели классификации был использован многофакторный дискриминантный анализ с пошаговым включением переменных в модель. Каждая переменная соответствовала относительному уровню экспрессии мРНК одного из 62 функциональных генов.

В программной среде дискриминантного анализа на основании результатов оценки экспрессии, были сформированы 4 молекулярных фенотипа для групп образцов неизмененных тканей, взятых при патологии в толстой кишке и из здоровой слизистой оболочки. На основании t-критерия были выделены наиболее значимые 44 гена, которые в дальнейшем послужили маркерами оценки вероятности принадлежности образца к группе.

С высокой достоверностью молекулярные фенотипы групп «норма» (95,1%), «неизменная слизистая при КРР» (86,4%) и «язвенный колит» (92,7%) соответствуют типу патологии (Таблица 1). Стоит отметить, что участки воспаления, доброкачественная и злокачественная опухоль располагались по ходу всей толстой кишки, в разных отделах, как в правой, так и левой ее половине. Образцы группы «неизменная слизистая при полипах» только в 44,4% распределялись правильно, в 55% случаев ошибочно были отнесены к группе «норма». Полученный результат можно объяснить преобладанием в исследуемой группе полипов без дисплазии и легкой степенью кишечной дисплазии в 68% случаев.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ДИСКРИМИНАНТНОГО АНАЛИЗА: СООТВЕТВИЕ КЛАССИФИКАЦИИ ОБРАЗЦОВ ПО МОЛЕКУЛЯРНОМУ ФЕНОТИПУ С ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЕМ ПО ТИПУ ПАТОЛОГИИ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Молекулярный фенотип	Частота совпадения классификации (%)	Распределение в группы ткани согласно модели дискриминантного анализа (n)			
		Норма	Неизменная слизистая при полипах	Язвенный колит	Неизменная слизистая при КРР
1	95,1	58	1	0	2
2	44,4	10	8	0	0
3	92,7	2	0	51	2
4	86,4	5	0	1	38

Примечание. В таблице представлено число корректно классифицированных образцов исследуемой группы (на диагонали таблицы) и тех, которые попали в другие группы. Строки обозначают истинное количество образцов в группе

При анализе был отобран 31 ген, вносящий наибольший вклад в формирование групп по молекулярному фенотипу. При КРР наиболее значимыми являлись гены, ответственные за процессы пролиферации (CCND1, CCNB1, P16INK4A) и апоптоза (BAX, NDRG1). Наличие подобных изменений может являться возможным отражением фенотипического фона, на котором возникла опухоль, или следствием влияния опухоли на нормальные ткани. Для группы «язвенный колит» наибольший вклад вносили гены иммунного ответа (IL7, IL8, TNFa), что отражает тип патологического процесса. Полученные результаты указывают на различие

экспрессионных фенотипов при гиперпролиферативной и воспалительной патологии в толстой кишке. Характер этих изменений, представленный различиями полученных экспрессионных фенотипов, показывает перспективы использования данного метода анализа для дифференциальной диагностики патологического процесса в толстой кишке.

Выводы: Модель дискриминантного анализа, полученная на основании исследования экспрессии 44 генов материала соскобов неизмененных тканей прямой кишки, позволяет с высокой вероятностью определить наличие и тип патологического процесса, протекающего в толстой кишке.

ТЕОРИЯ ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ ВТОРОГО РОДА ЛАНДАУ В ПРИЛОЖЕНИИ К АНАЛИЗУ ВЛИЯНИЯ ВОЗРАСТА И ПОЛА НА ЧАСТОТУ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ *JAK2V617F*

Суховольский В.Г.¹, Ковалев А.В.¹, Горбенко А.С.^{1,2}, Столяр М.А.^{1,2}, Ольховский И.А.^{1,2}

¹ ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

² Красноярский филиал ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Красноярск, Россия

Введение. Оценка зависимости выявления онкологических заболеваний от пола и возраста представляет интерес как с точки зрения изучения биологических механизмов канцерогенеза, так и с точки зрения организации планирования расходов здравоохранения в территориях с различной демографической структурой населения. Фазовые переходы второго рода характеризуют качественные изменения состояния изучаемого объекта, например, резкое увеличение частоты заболевания после достижения критического возраста T_c . В обычных координатах {парциальная частота мутаций q /возраст T } эти различия могут не наблюдаться, однако, после трансформации координат {квадрат парциальной частоты мутаций q^2 /обратный возраст $1/T$ }, появляется возможность выявления «точки перелома» в состоянии системы. Учитывая, что мутация *JAK2V617F* лежит в основе развития большинства случаев миелопролиферативных новообразований, представляет интерес оценка зависимости её распространенности с использованием модели фазовых переходов второго рода [1].

Цель работы: Оценка распространенности мутации *JAK2 V617F* у обследованных пациентов в зависимости от их возраста и пола с использованием модели фазового перехода второго рода

Материалы и методы. В работе анализировались результаты 9032 исследований на мутацию *V617F* в гене *JAK2* у взрослых пациентов из базы данных Красноярского филиала ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России. Выделение ДНК и определение мутации *JAK2 V617F* проводили методом аллель-специфической ПЦР в реальном времени

с использованием набора Миелоскрин ООО «Формула гена». В расчетах модели фазового перехода второго рода в качестве характеристики частоты встречаемости мутации *JAK2 V617F* использовался так называемый параметр порядка $q(k)$ — парциальная частота встречаемости мутации в отдельном возрастном диапазоне k . Зависимость квадрата парциальной частоты q^2 от обратного возраста $1/T$ в случае статистического соответствия с предлагаемой моделью, представляет собой график с двумя линейными участками и точкой перегиба. Более подробно применяемые математические методы описаны в работе [2]. Дополнительно приемлемость данной математической модели была проверена на опубликованных ранее данных популяционных исследований распространенности данной мутации.

Результаты. Предложенная модель как фазового перехода второго рода имеет следующий вид:

$$q^2 = \begin{cases} 0, & \frac{1}{T} \geq \frac{1}{T_c} \\ a - b \cdot \frac{1}{T}, & \frac{1}{T} < \frac{1}{T_c} \end{cases}$$

где a , b и $T_c = b/a$ — свободные параметры модели.

Проведенный анализ базы данных подтверждает их соответствие модели фазового перехода второго рода (1) (таблица 1). График зависимости имеет два четких линейных участка: первый с небольшим наклоном в молодом возрасте и второй — с гораздо более выраженным наклоном после достижения критического возраста T_c .

ТАБЛИЦА 1. ПАРАМЕТРЫ МОДЕЛИ ФАЗОВОГО ПЕРЕХОДА ВТОРОГО РОДА ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ — МУЖЧИН И ЖЕНЩИН ИЗ ИССЛЕДУЕМОЙ ВЫБОРКИ.

пол	Параметры	коэфф.	станд. ошибка	t-критерий	p
М	a	0.89	0.07	12.95	0.00
	b	41.85	4.42	9.46	0.00
	T_c	47.14			
	adjR ²	0.93			
	F	89.5			
Ж	a	0.78	0.07	11.89	0.00
	b	37.68	4.21	8.94	0.00
	T_c	48.51			
	adjR ²	0.92			
	F	79.9			

Данные свидетельствуют, что переломный критический возраст, по достижению которого начинается резкий рост частоты встречаемости мутации *JAK2 V617F*, и интенсивности её накопления у мужчин и женщин не различаются. Анализ ранее опубликованных данных суммарно по обоим полам [3] также подтверждает приемлемость использования данной модели. При этом получаются сравнимые данные по средним значениям критического возраста для лиц обоих полов (около 48 лет), что также согласуется с критическим возрастом усиления метилирования генов, участвующих в иммунных реакциях [4].

Заключение. Использование модели фазовых переходов второго рода позволяет выделить отдельные периоды и количественно оценить критический возраст перехода в фазу более высокой вероятности появления в популяции пациентов, несущих мутацию, ассоциирован-

ную с клональным гемопоэзом и развитием миелопролиферативных новообразований.

Литература

[1] Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Статистическая физика. М.: ФИЗМАТЛИТ. 2002. 616 с.

[2] Суховольский В. Г., Иванова Ю. Д., Shulman K., Мажаров В. Ф., Тарасова И. В., Тарасова О. В., Хлебопрос Р. Г. Популяционная динамика онкозаболеваний: модель фазового перехода второго рода // Биофизика 2015 № 4. с. 777–786.

[3] Patterson-Fortin, J., Moliterno, A.R. Molecular Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: Influence of Age and Gender. *Curr Hematol Malig Rep.* 2017, 12, 424–431.

[4] Johnson ND, Wiener HW, Smith AK, Nishitani S, Absher DM, Arnett DK, Aslibekyan S, Conneely KN. Non-linear patterns in age-related DNA methylation may reflect CD4+ T cell differentiation. *Epigenetics.* 2017 Jun 3;12(6):492-503.

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКСПРЕССИИ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК LINC00847 И PROX1-AS1 И МИКРОРНК MIR-647 В ПЛАЗМЕ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЖЕЛУДКА

Ветчинкина Е.А.¹, Буре И.В.¹, Калинин А.И.², Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Киселева А.Э.¹, Алексеева Е.А.¹, Немцова М.В.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), г. Москва, Россия

² ФГБНУ Медико-генетический научный центр, г. Москва, Россия

Введение/актуальность: Рак желудка (РЖ) занимает 3-е место в структуре смертности от онкологических заболеваний во всем мире. РЖ характеризуется высокой смертностью по причине того, что у большинства пациентов диагностируется уже поздняя стадия онкологии, когда наблюдается увеличение размеров первичной опухоли и развитие отдаленных метастазов. Открытие новых диагностических и прогностических маркеров имеет большое значение для своевременной диагностики и успешного лечения РЖ. Такими биомаркерами могут служить циркулирующие в кровотоке микроРНК и длинные некодирующие РНК (днРНК), участвующие в патогенезе многих заболеваний, в том числе онкологических. МикроРНК — это короткие одноцепочечные некодирующие РНК, которые контролируют разные физиологические процессы и играют важную роль в эпигенетической регуляции. Дифференциальная экспрессия различных микроРНК была ассоциирована с клинико-патологическими характеристиками рака, что делает интересным для дальнейшего изучения их потенциал в качестве прогностических опухолевых маркеров на ранних стадиях рака.

В результате анализа литературы, баз данных и использования компьютерных алгоритмов нами были выбраны днРНК LINC00847 и PROX1-AS1 и микроРНК miR-647, имеющие дифференциальную экспрессию при РЖ.

Цель: Определить связь экспрессии циркулирующих в плазме крови днРНК LINC00847 и PROX1-AS1 и микроРНК miR-647 с клинико-патологическими характеристиками

пациентов с раком желудка (РЖ) и оценить их потенциал в качестве прогностических биомаркеров.

Материалы и методы: В исследование были включены 40 образцов плазмы пациентов с РЖ и 19 образцов плазмы здоровых людей. Материал аннотирован с указанием локализации, клинической стадии, классификации по Лорен, наличия или отсутствия перстневидных клеток, по классификации TNM, а также возрасту, полу, общей выживаемости. Анализ экспрессии проведен с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ). Полученные значения проанализированы с использованием метода 2-ΔΔCt. Статистический анализ был выполнен с использованием Statistica 13.1 и критериев: Шапиро-Уилка, t-критерия Стьюдента, Манна-Уитни, однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), Краскела-Уоллиса. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

Результаты: Мы провели сравнение уровней экспрессии выбранных днРНК и микроРНК в плазме пациентов с РЖ относительно плазмы контрольной группы и обнаружили статистически достоверные различия: LINC00847 ($p=0,0001$), PROX1-AS1 ($p=0,0005$), miR-647 ($p < 0,0001$), что подтверждает их значение при развитии РЖ.

Для поиска значимых факторов, связанных с клиническим течением РЖ, мы провели анализ ассоциаций между изменением экспрессии циркулирующих в плазме днРНК и микроРНК и клиническими характеристиками пациентов с РЖ.

Средний уровень экспрессии LINC00847 в образцах плазмы пациентов с РЖ составил 12,91. Нами обнаружена дифференциальная экспрессия LINC00847 в плазме пациентов с РЖ в зависимости от наличия метастазов в региональных лимфоузлах N — по классификации TNM ($p=0,03$). В группе N0 средний уровень экспрессии был равен 14,66, в группе N1 понижался до 11,86, затем на N2 и N3 повышался до 22,07 и 21,85, соответственно. При сравнении других показателей установить статистически значимые различия не удалось.

Средний уровень экспрессии PROX1-AS1 в образцах плазмы пациентов с РЖ составил 13,14. Экспрессия PROX1-AS1 была связана с наличием перстневидных клеток ($p=0,014$) — средний уровень экспрессии был ниже —

11,44, чем при отсутствии перстневидных клеток — 15,26. При сравнении других показателей установить статистически значимые различия не удалось.

Средний уровень экспрессии микроРНК miR-647 в образцах плазмы пациентов с РЖ составил 12,37. Никаких значимых ассоциаций при сравнении экспрессии miR-647 в плазме крови пациентов с РЖ с клинико-патологическими характеристиками получено не было.

Выводы: Полученные нами данные показывают потенциальную прогностическую значимость экспрессии днРНК LINC00847 и PROX1-AS1 и микроРНК miR-647, циркулирующих в плазме крови, в качестве биомаркеров при РЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 20-75-10117-П).

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP2D6* У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ И ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗАМИ

Руденкова Т.В.¹, Костюк С.А.¹, Климович Н.Н.¹, Демиденко А.Н.², Суворов Д. И.³

¹ Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (ГУО БелМАПО), Минск, Республика Беларусь

² ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (ГУРНПЦ РМиЭЧ), Гомель, Республика Беларусь

³ ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» (ГУМНПЦ ХТуГ), Минск, Республика Беларусь

Введение. Острые лейкозы относят к наиболее распространенным видам злокачественных новообразований, поражающих все возрастные группы. Большие успехи достигнуты в области улучшения лечения острых лейкозов, однако, причины их развития остаются недостаточно изученными. На долю острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) приходится примерно 80% от всех диагностированных лейкозов среди детей в возрасте 0–19 лет. Детские формы ОЛЛ отличаются от форм, встречающихся во взрослом возрасте, по молекулярным (цитогенетическим) характеристикам, факторам риска и их лейкомогенному эффекту, чувствительности к химиотерапевтическим агентам и прогнозу [1]. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) чаще встречается среди взрослых и пожилых людей, без терапии быстро прогрессирует и имеет негативный прогноз [2].

К значимым факторам, ассоциированным с риском развития острых лейкозов, относят присутствие в геноме пациента полиморфных вариантов генов, контролирующих синтез ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, в том числе и полиморфных вариантов генов цитохрома P450 (*CYP*). Авторами исследований, посвященных оценке распространенности и влияния полиморфных вариантов генов *CYP* на развитие и течение заболевания, а также на формирование осложнений, подчеркивается, что полученные на определенной выборке результаты валидны только для конкретных изученных групп пациентов, т.к. распространенность полиморфизмов, а также характер их ассоциации с развитием лейкозов варьирует в различных этнических и расовых группах, а также может

изменяться в зависимости от межгенных взаимодействий, возраста пациента, подтипа лейкоза и др. [3].

Целью исследования было изучение распространенности полиморфизмов в генах цитохрома P450 (*CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP2D6*) у пациентов с острым лимфобластным и острым миелобластным лейкозами.

Материалы и методы. Объектом исследования явились 106 пациентов с ОЛЛ в возрасте от 1 до 17 лет, медиана возраста 5,2 года. Распределение по гендерной принадлежности равновеликое — 55 девочек (51,9%) и 51 мальчик (48,1%). Критериями включения пациентов в исследование являлось наличие диагноза ОЛЛ, проведение полихимиотерапии (ПХТ) не менее 2 месяцев по поводу основного заболевания, отсутствие токсических осложнений, включая синдромальную патологию, до начала лечения. Вторую группу исследования составили 49 пациентов с первичным острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) в возрасте от 25 до 64 лет (медиана возраста 42,6 лет). Распределение по гендерной принадлежности равновеликое — 26 мужчин (53,06%) и 23 женщины (46,95%). В качестве биологического материала у пациентов проводили взятие периферической крови. Выделение ДНК из крови проводили с использованием коммерческого набора реагентов «NucleoSpin Blood» («Macherey-Nagel»). ДНК, выделенную из биологического материала пациентов, использовали для амплификации фрагментов генов *CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP2D6*. Далее проводили рестрикцию амплифицированных фрагментов и электрофоретический анализ.

Результаты. В образцах крови пациентов с ОЛЛ и ОМЛ при поведении идентификации полиморфных вариантов генов *CYP1A1* (A4889G и T6235C) и *CYP2E1* (T7632A, G1293C и C1053T) доминирующими были аллели дикого типа, частота выявления которых составила более 90%. При изучении распространенности полиморфизма G1846A в гене *CYP2D6* было установлено, что дикий тип аллеля был преобладающим, как у пациентов с ОЛЛ (64,15%), так и у пациентов с ОМЛ (59,18%), также высокой была и частота выявления гетерозиготного аллеля: 30,19% и 38,78% соответственно. С применением методов статистического анализа не было выявлено достоверной взаимосвязи данных геновариантов с развитием ОЛЛ или ОМЛ ($p > 0,05$).

Для полиморфизма A2549del в гене *CYP2D6* было установлено, что среди обследованных пациентов с ОЛЛ преобладают носители аллеля дикого типа AA — 83,02% ($n=88$) случаев, в то время как среди пациентов с ОМЛ аллель дикого типа был выявлен только в 48,98% ($n=24$) случаев. Частота выявления гетерозиготного аллеля (A/del) составила 11,32% ($n=12$) случаев среди пациентов с ОЛЛ и 32,65% ($n=16$) случаев среди пациентов с ОМЛ. Мутантный аллель (del/del) был выявлен в 5,66% ($n=1$) случаев среди пациентов с ОЛЛ и в 18,37% ($n=9$) случаев среди пациентов с ОМЛ. С применением методов статистического анализа было установлено, что присутствие гетерозиготного A/del и мутантного del/del аллелей в гене *CYP2D6* ассоциированы с ОМЛ ($\chi^2=19,41$; $p < 0,001$; $F=18,63$, $p < 0,001$).

В 8 образцах (7,55%) пациентов с ОЛЛ и в 5 образцах ($n=10,20\%$) пациентов с ОМЛ из-за сложной структурной организацией гена *CYP2D6* и наличия межиндивидуальных особенностей структуры гена в области отжига подобранных пар праймеров для выявления полиморфизма C100T, не удалось получить ампликоны для дальнейшего анализа. Таким образом, анализ данного полиморфизма

проводили для 98 пациентов с ОЛЛ и 44 пациентов с ОМЛ. Присутствие дикого аллеля (CC) было выявлено у 53,06% ($n=52$) обследованных пациентов с ОЛЛ и у 50,00% ($n=22$) пациентов с ОМЛ; гетерозиготного геноварианта CT — у 21,43% ($n=21$) обследованных пациентов с ОЛЛ и у 20,45% ($n=9$) пациентов с ОМЛ; мутантного аллеля TT — у 25,51% ($n=25$) обследованных пациентов с ОЛЛ и у 29,55% ($n=13$) пациентов с ОМЛ. Статистический анализ не выявил достоверной взаимосвязи данного геноварианта с развитием заболевания ($p > 0,05$).

Заключение. Установлено, что присутствие гетерозиготного A/del и мутантного del/del аллелей в гене *CYP2D6* ассоциировано с ОМЛ. Так как ОМЛ поражает в основном пациентов взрослого и пожилого возраста, у которых скорость метаболических процессов снижается, то присутствие в геноме аллеля, который обуславливает синтез фермента биотрансформации со сниженной или отсутствующей активностью является фактором, способствующим развитию заболевания. Для изученных полиморфизмов в генах *CYP1A1*, *CYP2E1* не было выявлено ассоциации различных аллелей с развитием ОЛЛ или ОМЛ.

Список использованной литературы:

1. The Prenatal Origin of Childhood Leukemia: Potential Applications for Epidemiology and Newborn Screening / E. L. Marcotte [et al.] // *Front Pediatr.* — 2021. — Vol. 9. — doi:10.3389/fped.2021.639479.
2. Acute myeloid leukemia derived from lympho-myeloid clonal hematopoiesis. / F. Thol [et al.] // — *Leukemia.* — 2017. — Vol. 31, № 6. — P. 1286-1295. doi:10.1038/leu.2016.345.
3. Genetic Polymorphisms of Metabolic Enzymes CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 and Leukemia Susceptibility / H. C. Chen [et al.] // *European Journal of Cancer Prevention.* — 2018. — Vol. 17, № 3. — P. 251–58.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА УБИКВИТИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА UBE2Z В ОПУХОЛЕВОЙ И ПЕРИТУМОРАЛЬНОЙ ТКАНЯХ ПАЦИЕНТОВ С ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ОРГАНОВ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Соболева А.Г.^{1,2}, Арутюнян И.В.^{2,3}, Ельчанинов А.В.^{1,2}, Вишнякова П.А.^{2,3}, Полькин В.В.^{2,4}, Ратушный М.В.⁵, Поляков А.П.⁵, Гордон К.Б.^{2,4}, Фатхудинов Т.Х.^{1,2,3}

¹ НИИ Морфологии человека им. акад. А.П. Авцина, ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия;

² НИИ молекулярной и клеточной медицины ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия;

³ ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия.

⁵ МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Москва.

Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) занимает шестое место по распространенности в мировой популяции: ежегодно диагностируется до 890 000 новых случаев и 450 000 смертей. Новообразование развивается преимущественно в слизистых оболочках ротовой полости, носа, глотки и гортани. Основными факторами риска развития ПРГШ признаны инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ16, реже ВПЧ18), злоупотре-

бление алкоголем, курение и употребление жевательных смесей из листьев табака или бетеля. Поиск эффективных прогностических биомаркеров для диагностики опухолей на ранних стадиях и определения терапевтических мишеней способствуют повышению эффективности терапии пациентов с ПРГШ.

Трансформация клеток приводит к изменению метаболизма, который обуславливает злокачественный фенотип,

онкогенез и метастазирование раковых клеток. Убиквитинирование — один из ключевых механизмов регуляции процессов внутриклеточной деградации белков, а также модификации их функций. Целью работы было изучить характер экспрессии гена убиквитин-связывающего фермента E2 Z (UBE2Z) при развитии плоскоклеточного рака головы и шеи как потенциального прогностического маркера.

В исследовании использовали ткани опухоли и перитуморальной области 26 пациентов с диагностированным ПРГШ (ВПЧ-негативный подтип, без отдаленных метастазов, у 3 пациентов были подтверждены метастазы в лимфоузлы N1-N2b). Анализ экспрессии гена UBE2Z выполняли методом ПЦР-РВ. Полученные данные анализировали с помощью программ SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc, США) и StatTech v. 2.8.8 (разработчик — ООО «Статтех», Россия). Показатели относительной экспрессии сравнивали с помощью критерия Манна-Уитни (U) или t-критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Проведенный анализ показал достоверное повышение экспрессии гена UBE2Z в опухоли относительно перитуморальной области у 17 пациентов (65,4%) в среднем в 3,2 раза, у 9 пациентов уровень UBE2Z не менялся или незначительно снижался, что свидетельствует о возможной гетерогенности опухолей по данному признаку. Сравнение опухолевых тканей по локализации (гортань, язык, слизистые оболочки ротовой полости) также выявило различия в экспрессии исследуемого гена: содержание мРНК UBE2Z в опухоли гортани втрое превышало этот показатель в опухоли языка, при этом в тканях перитуморальной области было обнаружено аналогичное распределение.

Нарушение функционирования убиквитин-связывающих ферментов (UBE) может приводить к канцерогенезу, однако в настоящее время ни один ингибитор UBE фактически не используется в лечении рака, не смотря на потенциал терапевтической мишени (1). Не так давно у пациентов с ПРГШ было обнаружено дифференциальное содержание фермента убиквитинирования UBE2C, который

активировался в опухолевых тканях, был ассоциирован с метастазированием и коррелировал с низкой выживаемостью пациентов, поэтому его было предложено использовать в качестве потенциального прогностического маркера (2). Повышение экспрессии UBE2Z в опухолевой ткани ранее было выявлено у пациентов с аденокарциномой легких (3) и гепатоцеллюлярной карциномой (4). В нашем исследовании мы впервые показали стабильное повышение экспрессии UBE2Z в опухолевой ткани пациентов с ПРГШ без отдаленных метастазов.

Таким образом, UBE2Z имеет потенциал прогностического маркера; необходимо дальнейшее исследование активности UBE2Z в тканях пациентов с ПРГШ, в том числе с развитием отдаленных метастазов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения от 7 октября 2021 г. № 075-15-2021-1356 (внутренний номер Соглашения — 15.СИН.21.0011; идентификатор RF0951.61321X0012).

1. Du, X.; Song, H.; Shen, N.; Hua, R.; Yang, G. The Molecular Basis of Ubiquitin-Conjugating Enzymes (E2s) as a Potential Target for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3440. <https://doi.org/10.3390/ijms22073440>

2. Yang YF, Chang YC, Tsai KW, Hung MH, Kang BH. UBE2C triggers HIF-1 α -glycolytic flux in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cell Mol Med.* 2022 Jul;26(13):3716-3725. doi: 10.1111/jcmm.17400. Epub 2022 May 26. PMID: 35615976; PMCID: PMC9258705.

3. Yanyu Jiang, Shuaishuai Ni, Biying Xiao, Lijun Jia, Function, mechanism and drug discovery of ubiquitin and ubiquitin-like modification with multiomics profiling for cancer therapy, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2023. doi: [org/10.1016/j.apsb.2023.07.019](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.07.019)

4. Shi X, Wang B, Chen X, Zheng Y, Ding Y, Wang C. Upregulation of ubiquitin-conjugating enzyme E2Z is associated with human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Feb 26;523(1):25-32. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.170.

ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Л.В. Спирина^{1,2}, А.В. Августининович², С.Г. Афанасьев^{1,2}, С.В. Вторушин^{1,2}

¹ Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт онкологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Российская Федерация

Введение. Гетерогенность рака желудка является основной причиной развития неблагоприятного исхода заболевания.

Цель исследования заключалась в изучении связи генетических маркеров, ассоциированных с таргетной терапией и фенотипом опухоли с клинико-морфологическими особенностями опухоли эффективностью лечения больных с раком желудка.

Материалы исследования. В исследование были включены 21 пациент (12 мужчин, 8 женщин от 36 до 68 лет) с верифицированным диагнозом аденокарцинома

желудка, у которых на этапе диагностики была собрана биопсийные образцы. Парафиновые блоки которых были использованы для выделения ДНК. Пациенты получали комбинированное лечение по схеме FLOT с включением таргетных препаратов (при положительном HER2 статусе — герцептин и при положительном PD-L1 — пемролизумаб). Эффективность лечения оценивали с помощью критериев RECIST 1.1. Таргетное секвенирование участков генов человека методом парно-концевых прочтений было проведено с использованием метода амплификации участков геномной ДНК (ампликонная панель). Была ис-

пользована таргетная панель, состоящая из 48 генов: В ПАНЕЛЬ ONCONETIX (48 генов) *AKT1*, *ALK*, *APC*, *BRAF*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CTNNB1*, *DDR2*, *EGFR*, *EIF1AX*, *ERBB2*, *ERBB4*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FOXL2*, *GNA11*, *GNAQ*, *GNAS*, *H3F3A*, *HIST1H3B*, *HIST1H3C*, *HNF1A*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *KDR*, *KIT*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MET*, *MLH1*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PTEN*, *RET*, *ROS1*, *SF3B1*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *SMO*, *SRC*, *STK11*, *TERT*, *TP53*, *TSC1*, *VHL*.

Результаты исследования. В результате проведенного исследования было выявлено что регрессия наблюдалась у 14 пациентов (66,6%), из которых у 5 наблюдалась полная регрессия (11,1). Стабилизация была отмечена у 7 больных (33,6%). При анализе результатов таргетного секвенирования по 48 генам были выявлено 6 пациентов (33,3%) с отсутствием значимых маркеров, ассоциированных с ответом на терапию и с отсутствием генетические вариантов, имеющих отношение к фенотипу опухоли. Стоит отметить, что в 33,3 случаев (2 пациента) была зафиксирована полная регрессия, а в 66,7% (4 пациента) — частичная регрессия.

Из 14 пациентов с регрессией опухоли были выявлены 7 человек с наличием мутаций, ассоциированных с ответом на терапию и имеющих отношение к фенотипу опухоли. (Всего — 9 мутаций, у 2 больных отмечены по две мутации). Из 9 мутация были выявлено в 22,2% случаев мутация *PI3K* (chr3:g.178952085A>G chr3:g.178936091G>A), ассоцииро-

ванная с ответом на терапию, в 44,4% случаев — мутация *TP53*, 11,1% — *PTEN*, 11,1% — *ERBB* и в 11,1% — *MAPK*.

При стабилизации у пациентов отмечены 11 мутаций, из них двойные мутации отмечены у четырех человек. В 9,0% случаев зафиксирована мутация *KRAS* (chr12:g.25398284C>T), в 18,2 % — мутация *PI3K* (chr3:g.178952085A>G chr3:g.178936091G>A), ассоциированная с ответом на терапию, в 27,3% случаев — мутация *TP53*, 9,0% — мутация *PI3K*, 9,0% — мутация *PTEN*, 9,0% — мутация *SMAD4*; 9,0% — мутация *CTNNB*.

При этом положительный статус HER2 был отмечен у 4 пациентов, из которых 2 — не имели маркеров, ассоциированных с ответом на терапию и имеющих отношение к фенотипу опухоли, а у 2 — выявлены мутации гена *TP53*. У 5 пациентов с положительным PD-L1 в 20% случаев отмечена мутация *KRAS*, 20% — *TP53*, 20% — *PI3K*, 20% — *PTEN* и 20% — *ERBB*.

Заключение. Следовательно, лучший ответ на лечение отмечался у пациентов с отсутствием маркеров агрессивного роста. При этом сниженный ответ на терапию связан с наличием мутаций, ассоциированных с ответом на терапию и имеющих отношение к фенотипу опухоли, в том числе с наличием сочетанных мутаций. Отмечено накопление мутация в случае положительного PD-L1 статуса по данным ИГХ исследования.

РАЗРАБОТКА ТАРГЕТНОЙ ПАНЕЛИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК

Епифанова А.В., Жиганова М.С., Бабкин А.В., Антонова Е.Н., Кузьмин О.В., Кравцов И.С., Махлай А.А.

ФГУП «НЦ «Сигнал», Москва, Россия

Использование ингибиторов иммунных контрольных точек (ИКТ) в клинической практике позволило увеличить общую выживаемость пациентов с различными рецидивирующими и метастатическими злокачественными новообразованиями. Однако было замечено, что в результате терапии ингибиторами ИКТ среди пациентов наблюдается индивидуальная вариабельность в эффективности их применения и проявлении побочных реакций. Согласно результатам многочисленных клинических исследований отмечено, что эффективность иммунотерапии с использованием ингибиторов ИКТ обусловлена в том числе молекулярно-генетическими особенностями опухоли пациента.

Целью настоящего исследования являлась разработка таргетной панели олигонуклеотидов для оценки структурных особенностей генов, ассоциированных с эффективностью применения ингибиторов ИКТ, определения опухолевой мутационной нагрузки (ТМВ) и микросателлитной нестабильности (MSI), с использованием массового параллельного секвенирования.

Для апробации разработанной панели использовали

биоматериал 47 пациентов с установленным онкологическим диагнозом в соответствии с МКБ-10 (C34 — 15, C50 — 15, C16-7 и др.). Выделение ДНК из опухолевого материала проводили с использованием наборов: QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США). ДНК-библиотеки готовили с использованием реагентов для таргетного секвенирования Prep&Seq U-target DNA и Prep&Seq Oligos (Parseq Lab, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Подготовленные образцы секвенировали на платформе NextSeq 550 (Illumina, США). Биоинформатическую обработку и анализ данных проводили с помощью специализированного программного обеспечения (BWA, Samtools, GATK и др.) и баз данных (Varsome, OMIM, HGMD и др.).

В ходе проведенной работы была разработана и успешно апробирована таргетная панель олигонуклеотидов, позволяющая проводить массовое параллельное секвенирование целевых областей генов *ALK*, *BRAF*, *CD274*, *CTLA-4*, *DNMT3A*, *EGFR*, *ERBB2*, *JAK1/2*, *KEAP*, *KRAS*, *PTEN*, *STK11* и др., ассоциированных, по данным литературы, с эффективностью применения ингибиторов ИКТ. Наряду с этим в ходе апробации показана возможность использования

данной панели для оценки показателей TMB и MSI, являющихся важными предикторами эффективности применения иммунотерапии.

В результате проведенных исследований отмечена перспективность использования разработанной панели для прогнозирования эффективности применения ингибиторов ИКТ среди пациентов с различными солидными

опухолями. Использование персонализированного подхода в клинической практике, основанного на данных о молекулярно-генетических особенностях опухолей пациентов, позволит повысить эффективность фармакотерапии, снизить риски развития нежелательных побочных реакций, улучшить качество жизни и увеличить показатели общей выживаемости онкобольных.

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ УРОВНЯ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА BCR-ABL1 МЕТОДОМ ОТ-ПЦР-РВ

Куклина Н.Г., Авдоница М.А., Свешникова Е.Д., Шипулин Г.А.

Федеральное бюджетное государственное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства

Введение. Хронический миелолейкоз (ХМЛ) — это клональное опухолевое миелолиферативное новообразование, обусловленное злокачественным перерождением стволовых гемопоэтических клеток и характеризующееся усилением пролиферации гранулоцитарного роста без потери способности к дифференцировке, гиперплазией миелоидной ткани, миелоидной метаплазией кроветворных органов, ассоциированное с хромосомной аномалией — транслокацией t(9;22)(q34;q11), в результате которой образуется химерный ген BCR-ABL1. Современная концепция лечения ХМЛ, включает в себя оценку молекулярного ответа на основании количественного определения экспрессии гена BCR-ABL1 методом ПЦР в реальном времени. Однако данные, полученные с ее помощью, показывают межлабораторную вариабельность, что затрудняет назначение лечения и сравнение результатов клинических исследований. С целью стандартизации молекулярного мониторинга при ХМЛ в 2005 году была предложена Международная шкала (IS). Она основана на стандартизированном базовом уровне, определенном как 100 % BCR-ABL1 IS, и MMR (базовый молекулярный ответ), определенном как 0,1 % BCR-ABL1 IS (т. е. 3-логарифмическое снижение от стандартизированного базового уровня, также называемого MR3) (Hughes et al., 2006). Впоследствии было установлено, что желательны более глубокие молекулярные ответы (ГМО), определяемые как BCR-ABL1 IS \leq 0,01% (4-логарифмическое снижение MR4), BCR-ABL1 IS \leq 0,0032% (логарифмическое снижение 4,5MR4,5) и BCR-ABL1 IS \leq 0,001% (5 логарифмическое снижение MR5) (Cross N.C., et al 2012). Чтобы использовать эту систему, каждой лаборатории необходимо откалибровать свои данные в соответствии с IS путем умножения результата измерений на фактор конверсии (CF) для конкретной лаборатории (Branford et al., 2008). Однако получить CF непросто, поскольку для этого требуется обмен клиническими образцами между местными и референс-лабораториями. Для решения этой проблемы была разработана и одобрена ВОЗ первичная стандартная панель BCR-ABL1 на основе IS (White et al., 2010), доступ к которой в настоящий момент ограничен.

Цель данной работы — разработка набора реагентов для определения уровня относительной экспрессии гена BCR-ABL1 методом ОТ-ПЦР-РВ.

Материалы и методы. Разработанный набор реагентов включает в себя несколько специфичных пар праймеров и флуоресцентно-меченых зондов, обеспечивающих одновременное обнаружение экспрессии химерного гена BCR-ABL1 и гена ABL1. Олигонуклеотиды были подобраны на основании рекомендаций международной группы Europe Against Cancer (EAC) в 2003 г и позволяют выявлять 2 наиболее часто встречающиеся химерные транскрипты BCR-ABL1 — e13a2 (b2a2) и e14a2 (b3a2). Концентрации праймеров и флуоресцентно-меченых зондов были подобраны экспериментально.

В состав реакционной смеси входили следующие компоненты: 5x ОТ-ПЦР-Буфер, ревертаза, Taq полимеразы, dNTP, стерильная вода. Для проведения ОТ-ПЦР-реакции был использован прибор с детекцией в режиме реального времени DTprime (ООО «ДНК-Технология»).

Выделение РНК и прохождение реакции обратной транскрипции проводился при постановке реакции ПЦР с добавлением в те же пробирки специфично подобранных олигонуклеотидов на ABL1.

В качестве объекта исследования были использованы образцы РНК, полученные при выделении из 4-х клеточных стандартов с определенными концентрациями 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, приготовленные согласно процедуре, описанной White et al., 2010 г. Приготовление клеточных стандартов РНК BCR-ABL1 проводилось с использованием линий K-562 и NCU-F8. Количество клеток определяли с помощью автоматического счетчика Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo FS). Полученные стандарты были откалиброваны согласно протоколу WHO International Standard, 1st WHO International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL1 translocation NIBSC code: 09/138.

Для определения чувствительности использовали образцы РНК, выделенные из контрольных фаговых препаратов, содержащих b3a2 и b2a2 с известной концентрацией.

Основные результаты. В результате анализа образцов РНК, полученных из 4-х клеточных стандартов, определено, что разработанный набор реагентов позволяет выявить экспрессию химерного гена BCR-ABL1 на уровне 0,01%, что соответствует ГМО MR5. Эффективность реакции при этом составила 94%, коэффициент корреляции

0,99. Воспроизводимая чувствительность по контрольным фоговым препаратам составила 10 копий/мкл.

Заключение. Полученные результаты показывают, что разработанный набор реагентов может с достаточной точ-

ностью выявлять экспрессию химерного гена BCR-ABL1, а приготовленные и откалиброванные клеточные стандарты (согласно протоколу ВОЗ) позволяют стандартизовать анализ и привести в соответствии с Международной шкалой (IS).

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА В ОТНОШЕНИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ИНВАЗИВНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Мкртчян Л.С., Киселева В.И., Крикунова Л.И., Бойко Б.В., Замулаева И.А.

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России), Обнинск, Россия

Актуальность. Инфицированность вирусом папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) и молекулярно-генетические параметры ВПЧ ВКР могут оказывать влияние на результаты лучевой/химиолучевой терапии рака шейки матки (РШМ), однако гетерогенность клинического материала, зачастую без анализа максимально полного спектра качественных и количественных показателей ВПЧ ВКР не позволяет адекватно оценить прогностическую значимость особенностей папилломавирусной инфекции для клинического исхода РШМ.

Цель исследования. Оценить эффективность радикального лечения местнораспространенного РШМ в зависимости от молекулярно-генетических параметров ВПЧ-инфекции — ВПЧ-статуса, генотипа, вирусной нагрузки, физического статуса ДНК вируса.

Материал и методы. В исследование включено 135 больных РШМ II–III стадий (II стадия по FIGO — 62 (45,9%), III стадия — 73 (54,1%)), которым проведена лучевая/химиолучевая терапия. Средний возраст больных составил $48,8 \pm 11,8$ лет. По морфологической структуре лидировал плоскоклеточный рак различной степени дифференцировки — 119 (88,1%) случаев. У всех больных до начала лечения в совместных соскобах экзо- и эндоцервикса исследовали наличие, генотип и количественную нагрузку ВПЧ ВКР 14 генотипов (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68) методом ПЦР в реальном времени с использованием отечественных тест-систем производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора «ДНК-сорб-АМ» (выделение ДНК), «АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-титр FL Вирусную нагрузку (ВН) оценивали в соответствии со следующими критериями: $IgE7/105$ клеток < 3 — низкая; $3 \leq IgE7/105$ клеток < 5 — умеренная; $IgE7/105$ клеток ≥ 5 — высокая. Наличие интеграции ДНК ВПЧ оценивали по соотношению количества геномных эквивалентов E7/E2 вируса с учетом стандартного отклонения и коэффициента вариации данных в соответствии с разработанным алгоритмом. Принцип его основан на том, что ген E7 в процессе интеграции вирусной ДНК в ДНК клетки-хозяина сохраняется интактным, соответственно количество его в обеих формах вируса — эписомальной и интегрированной одинаковое. Ген E2 в процессе интегра-

ции в большинстве случаев разрушается и количество его снижается. Анализ проводили методом TagMan-технологии в формате мультиплекс-ПЦР в режиме реального времени с использованием набора реагентов, приготовленных в ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Кувва Д.А. и соавт., 2007), которые позволяют дифференцированно определять количество E2 и E7 вирусных генов и клеточного гена β -глобина. В одной пробирке амплифицировали участки генов E7 и E2 вирусов и участка ДНК β -глобина человека, который служил внутренним контролем реакции амплификации. Одновременно в каждом опыте амплифицировали стандартные образцы с известной концентрацией ДНК ВПЧ 16 и 18 и ДНК β -глобина (в копиях/мл). Каждый клинический и каждый стандартный образец исследовали в трех повторах. Количество E7 и E2 рассчитывали для каждого из трех повторов каждого гена по калибровочным кривым и уравнению регрессии, полученным на стандартных образцах в соответствии с программой амплификации этих генов. Степень интеграции ДНК ВПЧ рассчитывали по формуле $(1 - E2/E7) \times 100\%$, где E2 и E7 — это число геномных эквивалентов соответствующих генов.

Результаты: ВПЧ 16 и 18 типа диагностирован у 102 (75,6%) пациенток в качестве моноинфекции и у 13 (9,6%) в качестве ведущего генотипа в составе множественной инфекции. У 20 (14,8%) человек вирус не обнаружен (ВПЧ-негативные пациентки). Высокая вирусная нагрузка (в среднем $IgE7 = 6,6 \pm 1,3$) наблюдалась наиболее часто — у 88 (76,5%) больных. У 23 (20,0%) пациентов вирусная нагрузка была умеренной (в среднем $IgE7 = 4,3 \pm 0,5$), и лишь у 4 (3,5%) — низкой (в среднем $IgE7 = 1,4 \pm 1,1$). Наличие интеграции ДНК ВПЧ 16/18 различной степени в клеточный геном (интегрированная форма) установлено у большинства больных — в 66 случаях (57,4%), из них в 26 случаях наблюдалась полная (100%) интеграция ДНК вируса. Отсутствие интеграции (эписомальная форма) зарегистрировано у 49 (42,6%) больных. У больных со II и III стадиями заболевания статистически значимых различий в распределении количественных (уровень вирусной нагрузки) и качественных (интегрированная или эписомальная форма) параметров ВПЧ16/18 типов не наблюдалось

($p > 0,05$). Сравнительный анализ результатов лечения на сроке 5 лет (методом Каплан-Мейера) в зависимости от вирусной нагрузки не выявил статистически значимых различий безрецидивной выживаемости (БВ), независимо от стадии заболевания, на всех сроках наблюдения ($p > 0,05$). Изучение отдаленных результатов лечения в зависимости от физического статуса ДНК ВПЧ показало, что БВ больных с интегрированной формой ВПЧ 16/18 была значимо ниже, чем с эписомальной: при II стадии заболевания соответственно 100% и $72,0 \pm 8,5\%$ ($p=0,018$); при III стадии заболевания — соответственно $75,9 \pm 11,0\%$ и $36,9 \pm 10,1\%$ ($p = 0,011$). У ВПЧ-негативных больных выявлены достаточно низкие показатели 5-летней БВ, составившие при II стадии заболевания $50,3 \pm 35,3\%$, при III стадии — $39,2 \pm 14,3\%$, без значимых различий при сравнении с аналогичными показателями ВПЧ16/18 интегрированных форм опухоли ($p = 0,48$ и $p = 0,58$ — соответственно при II и III стадиях). Результаты исследования явились основанием для объединения больных с интегрированной ДНК ВПЧ16/18 и ВПЧ-негативных больных в одну группу, в результате чего был создан единый биомаркер — ВПЧ-негативность или наличие интеграции ДНК ВПЧ16/18 в клеточный геном. В группе больных РШМ II–III стадий относительный шанс (Odds Ratio, OR) неблагоприятного исхода заболевания оказался в несколько раз выше при наличии биомаркера, чем при его отсутствии, и достигал $9,5$ (95% ДИ $2,7$ —

$33,3$, $p = 0,0001$): при III стадии — $6,7$ (95% ДИ $1,4$ — $32,6$, $p = 0,0171$); для II стадии расчет OR не представлялся возможным, так как все находящиеся под наблюдением больные с эписомальной формой ВПЧ 16/18 были живы на сроке 5 лет без прогрессирования заболевания (по этой причине в формуле расчета OR в знаменатель попадал 0). БВ в прогностически благоприятной группе (отсутствие биомаркера) оказалась значимо выше, чем в прогностически неблагоприятной (наличие биомаркера) ($p = 0,0002$), составив на сроке 5 лет при II стадии РШМ — соответственно 100 и $70,8 \pm 8,3\%$ ($p = 0,01$), при III стадии — соответственно $75,9 \pm 11,0$ и $39,1 \pm 8,5\%$ ($p \leq 0,01$).

Выводы. Полученные данные подтверждают значимость биомаркера — ВПЧ-негативность или интеграция ДНК ВПЧ 16 или 18 типов в клеточный геном — для прогнозирования результатов лечения РШМ II–III стадий. В группе первичных больных с наличием этого биомаркера и, соответственно, с высоким риском плохого клинического исхода заболевания, независимо от стадии целесообразна персонализация специализированного лечения с возможной эскалацией при использовании дополнительных химио-, иммунотерапевтических и/или таргетных препаратов. Стоит также отметить, что прогностическое значение этого маркера при РШМ I стадии ждет дальнейших исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ РУТИННОГО ТЕСТИРОВАНИЯ МУТАЦИЙ ГЕНОВ HRR: КАКИМИ ДОЛЖНЫ БЫТЬ СЛЕДУЮЩИЕ ШАГИ?

Лебедева А.А.¹, Веселовский Е.М.^{1,2}, Кавун А.И.¹, Белова Е.В.^{1,3}, Григорьева Т.В.^{1,4}, Орлов П.С.⁵, Субботинская А.И.⁵, Шипунов М.В.⁵, Машков О.И.⁶, Билалов Ф.С.⁶, Дюжев Ж.⁷, Мигяев О.К.⁷, Вытнова Н.⁷, Милейко В.А.¹, Иванов М.В.^{1,8}

¹ ООО «Онкодиагностика Атлас» (Москва, Россия)

² Институт Биологии Развития им.Н.К.Кольцова РАН, Лаборатория Эволюционной Генетики (Москва, Россия)

³ Московский Государственный Университет им.М.В.Ломоносова (Москва, Россия)

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина РАН (Москва, Россия)

⁵ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины (Новосибирск, Россия)

⁶ ГБУЗ Республиканский медико-генетический центр (Уфа, Россия)

⁷ ООО «Лаборатория Гемотест» (Москва, Россия)

⁸ Московский физико-технический институт (Долгопрудный, Россия)

Введение. Накопленные данные позволяют предположить широкое применение ингибиторов PARP, в том числе за рамками текущих показаний. Для некоторых типов рака тестирование на мутации генов HRR стало рутинной клинической практикой. Тестирование на мутации в генах HRR позволяет выявить здоровых носителей и своевременно провести процедуры по снижению риска. Тем не менее, единого мнения относительно стратегий тестирования не существует. Здесь мы представляем реальные данные рутинного тестирования генов HRR в России.

Цель и задачи. Целью исследования являлось изучение спектра обнаруживаемых альтераций в генах HRR в реальной популяции российских больных с различными злокачественными новообразованиями.

Материалы и методы. Мы проанализировали клинико-морфологические характеристики и результаты секвенирования, полученные для пациентов, которым было проведено тестирование на наличие мутаций генов HRR (по крови или по образцу опухолевой ткани) в одной из 4 лабораторий в России. Тестирование было проведено методом NGS с использованием одной из двух панелей: Соло-тест ABC (гены BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2) или Соло-тест ABC HRR (15 генов HRR).

Основные результаты. Данные секвенирования были получены для 2032 пациентов, проходивших тестирования с 02.2021 по 02.2023. У большинства пациентов был рак молочной железы ($n=715$, 35.2%), рак яичников ($n=259$, 12.7%), рак поджелудочной железы ($n=85$, 4.2%) или рак предста-

тельной железы (n=58, 2.9%). Среди 487 пациентов, у 17.6% пациентов были выявлены делетирующие варианты (ДВ) в генах HRD (17.1% среди пациентов с РМЖ; 23.8% — РЯ; 8% — РПЖЖ; 6% — РПЖ); варианты неопределенного значения (VUS) были обнаружены у дополнительных 31.4% пациентов, у которых не было выявлено ДВ. Среди 51 обнаруженных ДВ в 242 образцах FFPE дополнительное тестирование для определения природы варианта (соматический/наследственный) потребовалось только в одном случае (0.4%), так как для остальных 50 вариантов были получены прогнозы с высокой степенью достоверности относительно природы варианта при тестировании только опухолевого материала. Большая часть обнаруженных наследственных вариантов в генах BRCA1/2 были ДВ (121 ДВ, 26 VUS), в то время как для не-BRCA1/2 генов наблюдалась обратная тенденция (53 ДВ, 132 VUS). Среди вариантов в не-BRCA1/2 генах 22 варианта обнаруживались более, чем в одном образце, причем 68.2%

из них были VUS. In silico оценка потенциального эффекта вариантов дала основание предположить, что для дополнительно 4.9% пациентов был потенциально упущен HRD ДВ-положительный результат при использовании 15-генной панели и 1.2% при использовании панели на 4 гена в связи с потенциально делетирующим эффектом обнаруженных нарушений. В то же время, в настоящий момент эти нарушения могут быть классифицированы только как VUS.

Заключение и выводы. Наше исследование является одним из первых по оценке встречаемости ДВ и VUS в генах HRR, обнаруженных с использованием NGS, в крупной когорте российских пациентов. Была продемонстрирована высокая эффективность стратегии тестирования опухоли для определения наследственных вариантов. Дальнейшие исследования должны быть направлены на изучение эффекта и интерпретацию часто обнаруживаемых VUS вариантов в не-BRCA1/2 генах.

ACMG AUTO CLASSIFIER: ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ КЛАССИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ НА ОСНОВЕ РУКОВОДСТВА ACMG

ACMG AUTO CLASSIFIER: SOFTWARE FOR AUTOMATIC CLASSIFICATION OF GENETIC VARIANTS BASED ON THE ACMG GUIDELINES

Некрасов А.Ю., Гуськова М.С., Лисица Т.С., Хахина А.О., Черняева Е.Н., Шипулин Г.А.
E-mail: ANekrasov1@cspfmbs.ru

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства; Россия, 119121 Москва, Погодинская ул., 10, стр. 1;

Введение. Классификация генетических вариантов, выявленных в результате проведения различных методик секвенирования генома человека, с целью установления степени их патогенности, является важным этапом поиска возможных причин множественных наследственных заболеваний. Наибольшее распространение, среди руководств по интерпретации генетических вариантов, получило руководство ACMG (American College of Medical Genetics) [1], включающее в себя 28 критериев патогенности, на основе различных комбинаций которых, выявленным генетическим вариантом присваивается класс патогенности. Использование данного руководства улучшает качество и точность интерпретации генетических вариантов. Однако большой объем выявляемых генетических вариантов, при помощи высокопроизводительных современных методов секвенирования нуклеиновых кислот, создает сложности их классификации в «ручном» режиме. Целью данной работы являлось создание автоматического классификатора генетических вариантов на основе на основе руководства ACMG по интерпретации генетических вариантов и широкого спектра доступных машиночитаемых геномных данных. Необходимость создания собственного программного обеспечения для классификации генетических вариантов связана в первую очередь с сохранением конфиденциальности генетических данных пациентов, что

невозможно сделать, при использовании стороннего программного обеспечения, располагающегося на удаленных серверах. Помимо этого, использование собственного программного обеспечения в перспективе позволит настраивать алгоритм с учетом данных и рекомендаций конкретной исследуемой нозологии (онкологические заболевания, заболевания сердечно-сосудистой системы и т.д.).

Материалы и методы. В качестве основного языка программирования, при создании алгоритмов классификатора, использовался Python 3.8. Компоненты классификатора включают в себя различное свободно доступное программное обеспечение для обработки файлов, содержащих данные высокопроизводительного секвенирования (SAMtools), аннотации генетических вариантов (Ensembl Variant Effect Predictor), а также хранения информации (PostgreSQL). В качестве источников данных, необходимых для присвоения критериев патогенности в рамках руководства ACMG по интерпретации генетических вариантов, использовались открытые базы данных (ClinVar, gnomAD, Domino, UniProt, ManeSelect, dbNSFP, SpliceAI, dbSNV, phyloP100way).

Алгоритм классификации ACMG [1] изначально основан на булевой логике, но в работе [2] показано, что можно свести алгоритм к балльной системе и именно эта версия реализована в классификаторе. Каждому крите-

рию сопоставляется число от 0 до 8 в зависимости от силы критерия. Итоговый балл является разностью между суммой патогенных критериев и суммой доброкачественных критериев, затем по этому итоговому баллу варианту присваивается класс патогенности.

Результаты. Разработан классификатор “ACMG Auto Classifier”, способный присваивать 16 из 28 критериев патогенности в автоматическом режиме (1 критерий, способный присваиваться в автоматическом режиме не был реализован ввиду отсутствия необходимых данных, оставшиеся 11 критериев являются индивидуальными для каждого конкретного клинического случая и могут быть присвоены только в ручном режиме дополнительно) для генетических вариантов 44 генов ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами. На вход программа принимает файл, содержащий данные о выявленных генетических вариантах в расширении vcf, на выходе формируется файл в расширении tsv, имеющий табличную структуру и содержащий информацию об аннотации и классификации каждого выявленного генетического варианта, с подробным описанием каждого из 16 присвоенных критериев патогенности.

Тестирование классификатора проводилось на 10 063 генетических вариантах, выявленных среди 3026 образцов, которым проводилось секвенирование целевых регионов 44 генов, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами. Из найденных вариантов 2976 есть в ClinVar, из которых только 1690 имеют необходимый уровень достоверности (рейтинг две звездочки). На основе 1690 вариантов проводилось сравнение результатов автоматической классификации с данными о патогенности из базы ClinVar. Коэффициент корреляции Спирмена для класса патогенности определенного классификатором и известным из ClinVar составил 0.86. Дополнительно был проведен тест без использования базы данных ClinVar, т.е. исключались признаки BP6 и PP5 [1]. Коэффициент корреляции

Спирмена составил 0.74.

Результаты автоматической классификации вариантов, отсутствующих в GnomAD и ClinVar, класса Патогенные или Вероятно патогенные проверялись вручную клиническим специалистом. Для 10 вариантов из 11 классификация совпала с фенотипом образца. В 1 варианте из 11 нельзя сделать выводы о правильности работы программы из-за низкого качества секвенирования образца. Так же эти 11 вариантов сравнивались с результатами классификации VarSome и показали совпадение.

Из 10 063 вариантов 272 варианта были классифицированы как Патогенные, 758 как Вероятно патогенные, 3526 как Неопределенного клинического значения, 4110 как Вероятно доброкачественные и 1397 как Доброкачественные.

Выводы. Представленное программное обеспечение позволяет быстро получать сведения о классе патогенности выявленных генетических вариантов в автоматическом режиме, что позволяет приоритезировать генетические варианты для дальнейшего их рассмотрения в качестве причины заболевания, а также уменьшает вероятность неточной классификации, уменьшая влияние человеческого фактора. В дальнейшем планируется калибровка классификатора для повышения точности, а также его настройка для различных синдромов (в т.ч. сердечно-сосудистых заболеваний).

Литература.

1. Richards S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // Genet. Med. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 17, № 5. P. 405–423.

2. Tavtigian S.V. et al. Fitting a naturally scaled point system to the ACMG/AMP variant classification guidelines // Hum. Mutat. Wiley Online Library, 2020. Vol. 41, № 10. P. 1734–1737.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЦР ПРИ ДЕПАРАФИНИЗАЦИИ СРЕЗОВ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Кипень В.Н.¹, Буракова А.А.¹, Добыш О.И.¹, Якубовский С.В.², Фридман М.В.^{2,3}, Кондратович В.А.³, Лемеш В.А.¹, Кондратенко Г.Г.²

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

³ Минский городской клинический онкологический центр», Минск, Беларусь

Введение. «Распространенность узловых образований щитовидной железы (ЩЖ) составляет от 2 до 65%, в зависимости от метода обнаружения. На долю рака щитовидной железы (РЩЖ) по отношению к доброкачественным образованиям приходится от 5 до 10%.

Провести дифференциальный диагноз заболеваний и исключить злокачественную патологию ЩЖ позволяет тонкоигольная аспирационная или пункционная биопсия (ТАБ), чувствительность которой составляет в среднем 80%

(70-98%), а специфичность — 92% (70-100%). В 30% случаев заключение оказывается неопределенным, так как цитологических признаков может быть недостаточно для определения доброкачественных и злокачественных опухолей ЩЖ. Определение молекулярных маркеров (в частности, микроРНК) в аспирате ЩЖ позволит более точно дифференцировать доброкачественные и злокачественные новообразования на дооперационном этапе и тем самым уменьшит количество нецелесообразных операций.» [1].

Экспрессионные профили микроРНК в клетке являются тканеспецифичными, а также подвергаются изменениям при развитии патологических процессов. По этой причине анализ профилей микроРНК рассматривается как перспективный метод дифференциальной диагностики онкологических заболеваний, в том числе опухолей ЩЖ.

Цель и задачи. Оценить эффективность четырех органических растворителей (бензол, толуол, о-ксилол, цетан) для депарафинизации срезов гистологического препарата РЩЖ, фиксированных формалином и залитых парафином.

Материалы и методы. Протокол депарафинизации среза гистологического препарата включал следующие стадии: 1. добавить 1000 мл растворителя к срезу гистологического препарата, инкубировать в течение 30-40 мин при 65 оС при периодическом вортексировании, контролировать процесс до полного растворения парафина; 2. центрифугировать в течение 1 мин при 10 000 об/мин при температуре 15-20 оС; 3. отобрать всю жидкую фракцию, стараясь не отбирать депарафинизированные фрагменты биологической ткани; 4. добавить 1000 мл 96% этанола, инкубировать в течение 10 мин при температуре 40 оС при периодическом вортексировании; 5. центрифугировать в течение 1 мин при 10 000 об/мин при температуре 15-20 оС; 6. отобрать всю жидкую фракцию, стараясь не отбирать депарафинизиро-

ванные фрагменты биологической ткани; 7. повторить пп.4-6; 8.добавить 200 мкл лизирующего раствора (рН 7,5: 10мМ трис-НСI; 10 мМ ЭДТА; 100 мМ NaCl; 2% SDS с добавлением протеиназы К [конечная концентрация — 0,3мг/мл]), инкубировать в течение 1 часа при температуре 56 оС при периодическом вортексировании. Для депарафинизации срезов гистологических препаратов было использовано несколько органических растворителей: бензол (химически чистый, массовая доля >99,9%), толуол (химически чистый, массовая доля >99,95%), о-ксилол (чистый для анализа, массовая доля >99,5%), цетан (эталонный, массовая доля >98,5%).

Основные результаты. Для апробации сформированного протокола для исследования микроРНК в гистологических препаратах были использованы микроРНК — hsa-miR-21-5p (индивидуальный номер на сайте www.mirbase.org — MIMAT0000076), hsa-miR-125a-3p (MIMAT0004602), hsa-miR-138-5p (MIMAT0000430), hsa-miR-146b-5p (MIMAT0002809) и U6 [2]. Проведены последовательные стадии молекулярно-генетического анализа: обратная транскрипция со специфическими олигонуклеотидами, синтез кДНК; количественная ПЦР в реальном времени (включая оценку специфичности), расчет значений порогового цикла (Ct). Для примера, рассчитанные значения Ct для hsa-miR-146b-5p представлены в таблице.

№ пробирки	Растворитель	Разведение	микроРНК	Ct	Tm, °C
1	бензол	1x	miR-146	39,841	78,688
1	бензол	1/10x	miR-146	38,796	80,148
2	толуол	1x	miR-146	36,707	81,900
2	толуол	1/10x	miR-146	42,980	78,542
3	о-ксилол	1x	miR-146	46,206	83,506
3	о-ксилол	1/10x	miR-146	38,977	83,214
4	цетан	1x	miR-146	33,767	82,338
4	цетан	1/10x	miR-146	37,100	83,360
5	бензол	1x	miR-146	36,502	82,922
5	бензол	1/10x	miR-146	39,049	83,214
6	толуол	1x	miR-146	32,322	82,484
6	толуол	1/10x	miR-146	35,198	82,630
7	о-ксилол	1x	miR-146	37,203	82,630
7	о-ксилол	1/10x	miR-146	39,067	83,068
8	цетан	1x	miR-146	31,529	82,338
8	цетан	1/10x	miR-146	35,100	82,484

На основании полученных данных, в совокупности по пяти исследованным микроРНК — hsa-miR-21-5p, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-146b-5p и U6, выявлено, что наименьшие значения Ct показаны для двух органических растворителей, а именно: толуол и цетан. Соответственно, их использованию будет отдано предпочтение в дальнейших исследованиях.

Заключение. В результате проведенных сравнительных исследований, направленных на выбор оптимальной схемы анализа для оценки экспрессии

микроРНК из биологического материала фиксированных формалином и залитых парафином гистологических препаратов ткани щитовидной железы человека, разработан протокол (методика) исследования, включающий последовательные стадии: получение на микротоме среза гистологического препарата; депарафинизация, выделение и очистка суммарной РНК и малых форм РНК (включая микроРНК); обратная транскрипция со специфическими олигонуклеотидами, синтез кДНК; количественная ПЦР в реальном времени

(включая оценку специфичности); расчет значений порогового цикла (Ct) для микроРНК; расчет изменения экспрессии микроРНК.

Исследование выполнено в рамках Договора № 2.2.7 на выполнение НИОК(Т)Р «Оценка экспрессии микроРНК в узловых образованиях щитовидной железы» в рамках задания 2.2.7 «Изучение молекулярно-генетического профиля узловых образований щитовидной железы, ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма 3.2 «Геномика, эпигеномика, биоинформатика»

Литература:

1. МикроРНК — перспективные молекулярные маркеры обнаружения рака в узлах щитовидной железы / О.С. Сердюкова, С.Е. Титов, Е.С. Малахина, О.Д. Рымар // Клиническая и экспериментальная тиреодология. 2018. Т.14(3). С.140-148.

2. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Ахмерова Л.Г., Веряскина Ю.А., Иванов М.К., Цивликова Е.С., Полоз Т.Л., Шевченко С.П., Карпинская Е.В., Жимулев И.Ф. Способ дифференциальной диагностики новообразований щитовидной железы человека // Патент RU2569154C1, Дата публикации: 08.10.2014

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ микроРНК ДЛЯ АПРОБАЦИИ ПРОТОКОЛА ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кипень В.Н.¹, Буракова А.А.¹, Добыш О.И.¹, Якубовский С.В.², Фридман М.В.^{2,3}, Кондратович В.А.³, Лемеш В.А.¹, Кондратенко Г.Г.²

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

³ Минский городской клинический онкологический центр, Минск, Беларусь

Введение. «Провести дифференциальный диагноз заболеваний и исключить злокачественную патологию щитовидной железы позволяет тонкоигольная аспирационная или пункционная биопсия (ТАБ), чувствительность которой составляет в среднем 80% (70-98%), а специфичность — 92% (70-100%). В 30% случаев заключение оказывается неопределенным, так как цитологических признаков может быть недостаточно для определения доброкачественных и злокачественных опухолей ЩЖ. Определение молекулярных маркеров (в частности, микроРНК) в аспирате ЩЖ позволит более точно дифференцировать доброкачественные и злокачественные новообразования на дооперационном этапе и тем самым уменьшит количество нецелесообразных операций.» [1].

Цель и задачи. С использованием синтетических микроРНК апробировать разработанный протокол для исследования цитологических препаратов.

Материалы и методы. Для сбора биологического материала с цитологического препарата (предметного стекла) использовали соскоб с применением одноразового скальпеля. Для выделения пула РНК с цитологического

препарата использовали набор «Лири» (Biolabmix, Россия) согласно оптимизированному протоколу. Синтез кДНК осуществляли со специфичными праймерами с использованием набора ArtMMLV Total (АртБиоТех, Беларусь). Апробацию сформированного протокола для исследования микроРНК в цитологических препаратах проводили для hsa-miR-125a-3p (индивидуальный номер на сайте www.mirbase.org — MIMAT0004602), hsa-miR-138-5p (MIMAT0000430) и hsa-miR-197-3p (MIMAT0000227) с использованием ПЦР в реальном времени (2x премикс, Праймтех, Беларусь). Для итоговой оценки специфичности ПЦР ампликоны для исследуемых микроРНК разделяли электрофорезом в 2,0%-ном агарозном геле (1x TAE) при напряжении 90 V в течение 50 мин. В качестве интеркалирующего красителя использовали EtBr. Результаты электрофореза документировали с помощью системы E-Box CX5 (Vilber, Германия), программное обеспечение E-Box CX5 TS Edge 18.01.

Основные результаты. Результаты эксперимента для hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-138-5p представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА ДЛЯ ТРЕХ МИКРООРНК

№ п/п	Разведение, раз	Кол-во матрицы, нг	Log	Ct
hsa-miR-125a-3p				
1	1	39,344	-3,67234	23,128
2	4	9,836	-2,28605	24,497
3	16	2,459	-0,89975	25,457
4	64	0,61475	0,48654	27,409
5	256	0,1536875	1,872834	29,469
6	1024	0,038421875	3,259128	31,192

7	4096	0,009605469	4,645423	33,668
8	16384	0,002401367	6,031717	36,245
9	65536	0,000600342	7,418011	36,902
10	262144	0,000150085	8,804306	41,936
11	1048576	3,75214E-05	10,1906	41,875
12	4194304	9,38034E-06	11,57689	54,314
hsa-miR-138-5p				
1	1	36,68	-3,60223	23,102
2	4	9,17	-2,21594	21,780
3	16	2,2925	-0,82964	21,929
4	64	0,573125	0,556651	23,594
5	256	0,14328125	1,942946	24,969
6	1024	0,035820313	3,32924	26,802
7	4096	0,008955078	4,715535	28,479
8	16384	0,002238771	6,101829	30,979
9	65536	0,000559692	7,488123	32,713
10	262144	0,000139923	8,874418	33,867
11	1048576	3,49808E-05	10,26071	33,485
12	4194304	8,74519E-06	11,64701	34,031
hsa-miR-197-3p				
1	1	23,46	-3,1553	24,549
2	4	5,865	-1,769	24,928
3	16	1,46625	-0,38271	26,127
4	64	0,3665625	1,003586	27,085
5	256	0,091640625	2,389881	29,451
6	1024	0,022910156	3,776175	31,741
7	4096	0,005727539	5,162469	33,711
8	16384	0,001431885	6,548764	35,163
9	65536	0,000357971	7,935058	35,683
10	262144	8,94928E-05	9,321352	38,819
11	1048576	2,23732E-05	10,70765	48,984
12	4194304	5,59330E-06	12,09394	38,747

Определено, что зависимость между количеством целевой матрицы в ПЦР (после Log-преобразования) и значением Ct для hsa-miR-125a-3 носит линейный характер в диапазоне 0,01-5,0 нг/реакцию (R=0,998), для hsa-miR-138-5p — в диапазоне 0,001-5,0 нг/реакцию (R=0,997) и для hsa-miR-197-3p — в диапазоне 0,01-2,0 нг/реакцию. Таким образом, сформированный алгоритм исследования микроРНК может использоваться при анализе биологического материала фиксированных цитологических препаратов.

Исследование выполнено в рамках Договора № 2.2.7

на выполнение НИОК(Т)Р «Оценка экспрессии микроРНК в узловых образованиях щитовидной железы» в рамках задания 2.2.7 «Изучение молекулярно-генетического профиля узловых образований щитовидной железы, ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма 3.2 «Геномика, эпигеномика, биоинформатика»

Литература:

1. МикроРНК — перспективные молекулярные маркеры обнаружения рака в узлах щитовидной железы / О.С. Сердюкова, С.Е. Титов, Е.С. Малахина, О.Д. Рымар // Клиническая и экспериментальная тиреодология. 2018. Т.14(3). С.140-148.

ОПЫТ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ МЕТОДОМ NGS У ПАЦИЕНТОВ С СОЛИДНЫМИ ОПУХОЛЯМИ ПО ОПУХОЛЕВОМУ МАТЕРИАЛУ И В ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ

Лебедева А.А.¹, Григорьева Т.В.^{1,2,3}, Кузнецова О.А.^{1,4}, Белова Е.В.^{1,5}, Кавун А.И.¹, Алиярова С.И.¹, Веселовский Е.М.¹, Трякин А.А.⁴, Федянин М.Ю.^{3,4,6}, Милейко В.А.¹, Иванов М.В.^{1,7}

¹ ООО «Онкодиагностика Атлас» (Москва, Россия)

² ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Москва, Россия)

³ ФГАОУ «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава РФ (Москва, Россия)

⁴ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ (Москва, Россия)

⁵ МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва, Россия)

⁶ ММКЦ «Коммунарка» Минздрава РФ (Москва, Россия)

⁷ МФТИ (Национальный исследовательский университет) (Долгопрудный, Россия)

Введение. Ввиду внедрения ингибиторов контрольных точек иммунного ответа (ИКТИО) для лечения широкого спектра солидных опухолей, в том числе всех солидных опухолей при наличии микросателлитной нестабильности (MSI), разработка методов для высокоточного детектирования MSI при помощи секвенирования следующего поколения (NGS) является востребованной задачей прецизионной онкологии.

Цели и задачи исследования. Целью исследования являлась разработка и валидация тест-системы на основе NGS, которая позволила бы детектировать MSI в FFPE и в жидкостной биопсии у пациентов с различными солидными опухолями. Кроме того, одной из задач исследования являлось изучение встречаемости MSI в различных солидных опухолях.

Методы. Для разработки метода определения MSI были предварительно отобраны микросателлитные повторы (локусы). Валидация тест-системы проводилась с использованием биологического материала пациентов с различными солидными опухолями: Г1 — архивный FFPE материал пациентов с известным статусом микросателлитной нестабильности (метод определения — ИГХ/ПЦР); Г2 — архивный парный (FFPE/цодНК) материал пациентов с онкологическими заболеваниями, в которых крайне редко встречается (<1%) микросателлитная нестабильность (ИГХ/ПЦР не проводилось); Г3 — парный (FFPE/цодНК) материал MSI+ пациентов. Для всех пациентов (Г1, Г3) по FFPE материалу был проведен анализ MSI конвенциональными методами (“золотой стандарт”): ИГХ (анализ экспрессии MLH1, MSH2, PMS2, MSH6) и ПЦР (анализ локусов NR-21, BAT-26, BAT-25, NR-24, NR-27). Положительными (MSI+) считались случаи, когда по результатам одного из конвенциональных методов анализа (ПЦР или ИГХ) выявлялся MSI+ статус. Отрицательными (MSI-) считались случаи, при которых по результатам ИГХ, и ПЦР был MSI— статус. Детектирование MSI в данных секвенирования производилось с помощью анализа представленности k-меров 28 микросателлитных повторов.

Результаты. Всего были проанализированы образцы 109 пациентов: у 43 (39.4%) пациентов был немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), у 30 (27.5%) был колоректальный рак (КРР), у 16 (14.7%) был рак молочной железы (РМЖ), у 13 (11.9%) была меланома кожи, у 6 (5.5%) был рак желудка

(РЖ), у 1 (0.9%) пациента была опухоль ЖКТ без уточнения. Суммарно было проанализировано 123 образца: 77 (62.6%) опухолевых образцов и 46 (37.4%) образцов жидкостной биопсии, для 6 (5.5%) пациентов были доступны парные образцы опухоли и жидкостной биопсии. В Г1 было набрано 30 FFPE образцов (25 — КРР, 4 — РЖ, 1 — опухоль ЖКТ без уточнения); в Г2 было отобрано 72 образца (43 — НМРЛ, 13 — РМЖ, 13 — меланома), из которых 41 — FFPE, 31 — материал жидкостной биопсии; в Г3 был набран 21 образец для 6 пациентов (4 КРР, 2 РЖ), из них 6 образцов опухолевой ткани и 15 образцов жидкостной биопсии (в среднем 2.5 образца жидкостной биопсии на 1 пациента, максимальное значение — 4).

Уровень согласия (κ) между NGS и “золотым стандартом” (ИГХ или ПЦР) в Г1 составил 0.8 (95% ДИ, 0.58-1) [уровень согласия (κ) с ПЦР 0.93 (95% ДИ, 0.8-1)], в Г3 — 1. В Г2 для 31 (100%) наблюдался MSS статус по результатам NGS. В Г3 для всех 6 образцов FFPE не было расхождений между результатами конвенциональных методов и NGS.

При сравнении результатов анализа MSI “золотым стандартом” и NGS с использованием всего FFPE материала из всех подгрупп уровень согласия (κ) составила 0.9 (95% ДИ, 0.88-0.92). При сравнении результатов анализа конвенциональными методами FFPE образцов была выявлена низкая конкордантность между результатами MSI, полученных ИГХ и ПЦР (κ=0.5, 95% ДИ, 0.22-0.78). При сравнении ПЦР и NGS наблюдалась высокая конкордантность результатов MSI (κ=0.94, 95% ДИ, 0.83-1). Однако, конкордантность результатов, полученных ИГХ и NGS, была ниже (κ=0.55, 95% ДИ, 0.28-0.83).

Чувствительность / специфичность NGS в отношении детектирования MSI при сравнении с ИГХ составила 76.2% / 80%. Чувствительность / специфичность NGS в отношении детектирования MSI при сравнении с ПЦР составила 95.5% / 100%.

Чувствительность / специфичность NGS в отношении детектирования MSI по cfDNA при сравнении с NGS по FFPE составила 100% / 100%.

Выводы. При сравнении результатов анализа конвенциональными методами FFPE образцов была выявлена относительно низкая конкордантность между результата-

ми MSI, полученными ИГХ и ПЦР ($\kappa=0.5$, 95% ДИ, 0.22-0.78). При сравнении ПЦР и NGS наблюдалась высокая конкордантность результатов MSI ($\kappa=0.94$, 95% ДИ, 0.83-1), конкордантность результатов, полученных ИГХ и NGS, была

ниже ($\kappa=0.55$, 95% ДИ, 0.28-0.83). Чувствительность детектирования MSI по cfDNA составила 100%. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-75-10154, <https://rscf.ru/project/22-75-10154/>

STUDY OF POLYMORPHISM OF ICAM-1 GENE IN COLORECTAL CANCER

A. Mokrane^{1,2}

¹ Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, 603950 Russia

² University of Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, 15000 Algeria.

E-mail: mokraneahlem@gmail.com

Introduction. ICAM-1, known as CD54, which is expressed on the surface of hematopoietic and non-hematopoietic cell lines, such as white blood cells, endothelial cells, fibroblasts, B cells, T lymphocytes and NK cells. Two single nucleotide polymorphisms have been described in exons encoding the extracellular domains of the ICAM-1 gene. The first polymorphism encodes exon 4 at position +241 of glycine arginine (G241R), the second polymorphism encodes exon 6 at position +469, which changes glutamic acid to lysine. ICAM-1 is a receptor membrane, but it has several functions. ICAM-1 allows extravasation of leukocytes through interaction with $\beta 2$ -integrins. It plays an important role in the inflammatory response, and its expression is regulated by transcription using various cellular pathway signals. ICAM-1 also plays a crucial role in several malignant tumors, including breast, gastric and colorectal cancer. Several recently published articles have addressed the relationship between ICAM-1 gene polymorphisms and tumor susceptibility, but their

results remain inconsistent. This lack of consistency could be attributed to the presence of genetic heterogeneity between ethnic populations, and small sample sizes.

Research objective. The aim of this study was to evaluate the association between ICAM-1 K469E polymorphisms and the risk of colorectal cancer.

Material and method. 56 samples of peripheral blood of patients with colorectal cancer from the Nizhny Novgorod State Medical Academy. The genotypic distribution of the rs5498 E469K(A/G) gene polymorphism was carried out using a specific polymerase chain reaction allele.

Results. Our results show that colorectal cancer patients carrying the GG genotype and the AG genotype represent an important significant difference ($p=0.002$; $OR=1.35$, $p=0.002$; $OR=3.55$, respectively).

Conclusion. Our results revealed a probable existence of a relationship between the polymorphism of ICAM-1 SNP rs5498 (E469K) and colorectal cancer.

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Карташова А.Д., Михайлец Э.С., Плотникова Л.В., Поляничко А.М.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Актуальность. Множественная миелома (ММ) — онкологическое заболевание крови, характеризующееся неконтролируемым размножением клональных злокачественных плазматических клеток в костном мозге, что приводит к избыточной продукции иммуноглобулинов одного типа или же его частей, например, свободных лёгких цепей. Такие иммуноглобулины принято называть «парапротеинами» или «М-протеинами». Данное заболевание составляет примерно 10% от всех онкогематологических заболеваний и является неизлечимым.

Цель работы. Работа посвящена разработке методики скрининга, направленного на выявление признаков множественной миеломы на основе анализа ИК спектров сыворотки крови.

Материалы и методы. В работе проведен анализ сыворотки крови больных множественной миеломой, на-

ходящихся под наблюдением гематологической клиники Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии (Санкт-Петербург, Россия). Образцы были получены сотрудниками НИИ Гематологии и трансфузиологии в соответствии по стандартным клиническим протоколам. В данном исследовании были проанализированы образцы от 25 здоровых доноров, 36 больных ММ. У 8 пациентов была диагностирована несекретирующая форма множественной миеломы. Среди больных было 17 мужчин и 19 женщин. Возраст этой группы пациентов находился в диапазоне от 44 до 82 лет, средний возраст составил 61 год.

В работе был проведён сравнительный анализ двух различных методик: ИК-спектроскопии пропускания с изотопным замещением растворителя и ИК-спектроскопии НРВО, где образцы исследовались без какой-либо допол-

нительной пробоподготовки. Анализ спектров поглощения проводился с применением метода Фурье самодеконволюции и метода второй производной. В результате проделанной работы для каждой методики предложены количественные критерии быстрого разделения образцов сыворотки крови по признаку наличия или отсутствия в них патологического белка, характерного для данного заболевания.

Основные результаты и выводы. В работе показано, что используемый подход позволяет производить разделение групп здоровых доноров и больных ММ по количеству содержания во вторичной структуре образцов α -спиралей и β -слоистых структур. Опираясь на полученные результаты, можно заключить, что предложенный подход пригоден для выявления признаков ММ при условии наличия парапротеина в образцах сыворотки крови. Было установлено, что для точек, соответствующих образцам сыворотки здоровых доноров, значения α/β лежат в пределах $0,68 \pm 0,87$ для жидких образцов и в интервале $0,46 \pm 0,74$ для пленок. Для образцов секретируемой ММ соответствуют значения соотношения $0,17 \pm 0,42$ и $0,16 \pm 0,39$

для жидких образцов и пленок соответственно.

Благодарности. Образцы сыворотки крови были любезно предоставлены Федеральным государственным бюджетным учреждением "Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства" (г. Санкт-Петербург). Часть работ выполнена с использованием оборудования Научного парка СПбГУ (Оптические и лазерные методы исследования вещества, Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники, Криогенный отдел).

1. Mikhailets E.S. et al. Protein secondary structure analysis of serum from patients with oncohematological diseases // Journal of Physics Conference Series. 2021. V. 2103. No. 1. P. 012053.

2. Чернышев Д. А. и др. Особенности ИК спектров сыворотки крови больных множественной миеломой. // Оптика и спектроскопия. 2023. Т. 131, № 6, С. 805-809.

3. Тельная Е. А. и др. Инфракрасная спектроскопия сыворотки крови больных онкогематологическими заболеваниями // Биофизика. 2020. Т. 65. № 6. С. 1154-1160.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА CYP450 СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПОЛУЧАВШИХ НЕОАДЪЮВАНТНУЮ ПОЛИХИМИОТЕРАПИЮ

Кипень В.Н.¹, Добыш О.И.¹, Ходоронок Е.И.², Хоров А.О.², Лемеш В.А.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, аг. Лесной, Беларусь

Введение. Лекарственная устойчивость является одним из явлений, ответственных за отсутствие ответа на химиотерапию и возникновение рецидива заболевания, устойчивого к дальнейшим химическим соединениям. Это зависит от нескольких модификаций, происходящих в клетках во время онкогенеза, и от воздействия химиотерапевтических препаратов. Эффективность химиотерапии зависит от нескольких последовательных событий: поглощение препарата клеткой, уклонение от метаболической инактивации, взаимодействие с макромолекулой-мишенью, уклонение от пути восстановления и возникновение апоптоза. В частности, на метаболизм и поглощение лекарств влияют ферменты цитохрома P450 (CYP450). Метаболизм лекарственных средств происходит в основном в печени, где метаболизирующие ферменты находятся в высоких концентрациях, а также в тонкой кишке и в почках. Метаболизм лекарственных соединений происходит через различные модификации, заключающиеся во введении функциональных химических групп путем окисления, восстановления, гидролиз. Хотя члены семейства CYP450 имеют свои специфические субстраты, которые они метаболизируют, нередко один и тот же препарат может метаболизироваться более одного фермента, создавая избыточность в этом важном механизме защиты от токсических веществ. CYP3A, CYP2D6 и CYP2C отвечают за метаболизм более 75% лекарств. Но

эти ферменты генетически полиморфны: варианты аллели у значительной части населения кодируют ферменты со значительно измененной активностью. Поскольку наличие этих вариантов аллелей можно определить проспективно, генетический анализ вариантов аллелей может оказаться ценным инструментом для прогнозирования результатов противоопухолевой терапии [1-3]. Современный подход дозирования лекарств при неоадъювантной (предоперационной) химиотерапии (НАХТ) должен учитывать индивидуальную способность пациента метаболизировать назначаемый химиопрепарат, что позволит достичь максимального противоопухолевого эффекта и свести к минимуму побочные явления индукционной терапии. В качестве потенциальных биомаркеров эффективности НАХТ могут выступать полиморфизмы в генах семейства цитохром P450 (CYP), влияющие на активность или на экспрессию мишени для лекарственного средства.

Цель и задачи. Оценить частоту распространенности генотипов по CYP19A1 (rs1008805), CYP3A4 (rs2740574), CYP2C19 (rs4244285), CYP2C19 (rs12248560), CYP3A5 (rs776746), CYP2C9 (rs1799853) и CYP1B1 (rs1056836) среди пациентов с раком молочной железы (РМЖ), которым проводилась неоадъювантная химиотерапия (НАХТ).

Материалы и методы. Материалом для молекулярно-генетических исследований являлась венозная

кровь 150 пациентов с клинически верифицированным диагнозом злокачественное новообразование молочной железы (МКБ-10 C.50). Венозная кровь отбиралась в пробирки с цитратом натрия 3,8% Citrate (9NC 0,129M) IMPROVE. Для выделения ДНК из лейкоцитов отбирали аликвоту в 100 мкл, остаток хранили при -20°C . Забор крови осуществляли сотрудники РНПЦ онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова (г. Лесной, Республика Беларусь). ДНК выделяли из цель-

ной крови с использованием набора «ArtДНК MiniSpin Эксперт» (ООО «АртБиоТех», Беларусь). Для установления аллельного состава генов *CYP19A1* (rs1008805), *CYP3A4* (rs2740574), *CYP2C19* (rs4244285), *CYP2C19* (rs12248560), *CYP3A5* (rs776746), *CYP2C9* (rs1799853) и *CYP1B1* (rs1056836) использовали наборы праймеров KASP by Design Primer Mix (LGC, Biosearch Technologies), содержащие аллель-специфичные праймеры для каждого исследуемого полиморфизма.

Полиморфизм	Ген	Генотип	Кол-во пациентов	Частота генотипа, %
rs1008805	CYP19A1	AA	68	45,33
		AG	58	38,67
		GG	24	16,00
rs4244285	CYP2C19	AA	9	6,00
		AG	34	22,67
		GG	107	71,33
rs12248560	CYP2C19	CC	85	56,67
		CT	52	34,67
		TT	13	8,67
rs776746	CYP3A5	CC	133	88,67
		CT	16	10,67
		TT	1	0,67
rs1799853	CYP2C9	CC	124	82,67
		CT	26	17,33
		TT	–	–
rs1056836	CYP1B1	CC	26	17,33
		CG	68	45,33
		GG	56	37,33
rs2740574	CYP3A4	CC	–	–
		CT	9	6,00
		TT	141	94,00

Основные результаты. В таблице приведены полученные результаты. Выявлено, что для rs1008805 (*CYP19A1*) частота минорного аллеля G составила 35,33% (95% ДИ 29,80-40,86), для rs4244285 (*CYP2C19*) аллель A — 17,33% (95% ДИ 12,95-21,71), rs12248560 (*CYP2C19*) аллель T — 26,00% (95% ДИ 20,93-31,07), rs776746 (*CYP3A5*) аллель T — 6,00% (95% ДИ 3,25-8,75), rs1799853 (*CYP2C9*) аллель T — 8,67% (95% ДИ 5,42-11,92), rs1056836 (*CYP1B1*) аллель C — 40,00% (95% ДИ 34,33-45,67), для rs2740574 (*CYP3A4*) аллель C — 3,00% (95% ДИ 1,03-4,97).

Показано, что при сравнении с популяционными данными, полученными в рамках крупномасштабного проекта 1000Genomes для популяции «Еуроге» наибольшие отклонение частоты распространенности минорных аллелей были характерны для rs1008805, rs1799853 и rs12248560 — 9,40%,

3,76% и 3,63% соответственно. Наличие трех и более минорных аллелей по исследуемым полиморфизмам было выявлено у 40,0% пациентов, четырех и более — у 8,0% пациентов.

Заключение. В дальнейшем планируется продолжить молекулярно-генетические исследования (увеличение объема выборки до 215 человек), а также провести ассоциативный анализ с клинико-морфологическими характеристиками опухоли при НПХТ для пациентов с РМЖ.

Исследование выполнено в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма 3.2 «Геномика, эпигеномика, биоинформатика» на 2021-2025 гг., задание «Роль полиморфных вариантов ряда генов, ассоциированных с метаболизмом лекарственных средств, в формировании противоопухолевого ответа на неоадъювантную химиотерапию при раке молочной железы» на 2021-2023 гг.

Литература:

1. The Coordinated Role of CYP450 Enzymes and P-gp in Determining Cancer Resistance to Chemotherapy / Azzariti, A. [et al.] // *Current Drug Metabolism*. 2011. Vol.12(8). pp.713–721.

2. Polymorphisms in Phase I (CYP450) Genes CYP1A1 (rs4646421), CYP1B1 (rs1056836), CYP19A1 (rs749292) and CYP2C8 (rs1058930) and Their Relation to Risk of Breast

Cancer: A Case-Control Study in Mazandaran Province in North of Iran / Golmohammadzadeh G. [et al.] // *Open Access Maced. J. Med. Sci.* 2019. Vol.7(15). pp.2488-2496.

3. Comprehensive assessment of cytochromes P450 and transporter genetics with endoxifen concentration during tamoxifen treatment / Marcath L.A. [et al.] / *Pharmacogenet Genomics*. 2017. Vol.27(11). pp. 402-409.

СООТНОШЕНИЕ СВЯЗАННОГО И НЕ СВЯЗАННОГО С МЕТАЛЛАМИ ТРАНСФЕРРИНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЯИЧНИКОВ

Сачко А.М.^{1,3}, Горяйнова О.С.¹, Иванова Т.И.^{1,2}, Сыченкова Н.И.², Болотникова О.И.³, Тиллиб С.В.¹

¹ Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), Москва, Россия

² МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ), Санкт-Петербург, Россия

Введение. Рак яичников (РЯ) является первой по значимости причиной смертности среди онкогинекологических заболеваний и в 75% случаев диагностируется на III-IV стадиях. Методы скрининга населения отсутствуют, поэтому поиск потенциальных маркеров актуален. Эпидемиологические исследования выявили ассоциации между нарушением метаболизма железа и РЯ [1].

Цель. Оценка значимости изменения соотношения голотрансферрина (holo-Tf, железосвязанный) и апотрансферрина (apo-Tf, свободный от железа) в плазме крови пациентов для ранней диагностики РЯ.

Материалы и методы. Анализ соотношения holo-Tf / apo-Tf в плазме 8 пациенток с диагнозом РЯ (от 34 до 70 лет, 90% — серозная карцинома высокой степени злокачественности) и 3 здоровых женщин проводили методом иммуноаффинного фракционирования, применяя новые иммуносорбенты, создаваемые на основе ранее полученных однодоменных антител (нанотел, [2]), которые дифференциально связывают различные формы трансферрина, как описано нами ранее [3]. Адаптированные нанотела, специфичные к holo-Tf и apo-Tf, нарабатывали в периплазме бактерий *E.coli*, очищали с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии, иммобилизовали на CNBr-активированной сефарозе 4B (GE Healthcare Life Sciences, США). Образцы плазмы крови наносили на индивидуальные колонки. Связавшиеся белки элюировали и затем фракционировали с помощью электрофореза в 5-19% градиентном SDS-полиакриламидном геле (по Лэммли) в невозобновляющих условиях. Белки в геле окрашивали Imperial Protein Stain (Thermo Fisher Scientific, США). Электрофореграмма позволяет детектировать и анализировать количество и соотношение различных форм трансферрина. Количество holo-Tf и apo-Tf в полосе на элетрофореграмме оценивали в программе Adobe Photoshop CS6. Для обна-

ружения различий между двумя группами применяли тест Манн-Уитни.

Результаты. Полученные данные выявили значимые отличия между соотношениями holo-Tf/apo-Tf в плазме больных РЯ и здоровых женщин. Пациентки с РЯ характеризовались значимым ($p = 0,01$) относительным снижением доли holo-Tf, медиана 18,1% (разброс от 10% до 23%), и увеличением доли apo-Tf, медиана 81,9% (разброс от 77% до 90%), по сравнению с контролем, медиана которого равна у holo-Tf 40% (разброс от 30% до 55%) и у apo-Tf 60% (разброс от 45% до 70%). Медиана соотношения holo-Tf/apo-Tf у больных почти в три раза меньше, чем у здоровых и равна 0,22 (разброс от 0,11 до 0,30), а у здоровых — 0,70 (разброс от 0,45 до 1,26) ($p = 0,012$).

Выводы. Анализ соотношения holo-Tf/apo-Tf в плазме крови можно рассматривать в качестве вероятного биомаркера ранней диагностики РЯ и дополнительного критерия при формировании группы риска. Полученные данные имеют предварительный характер, так как используемая выборка образцов плазмы ограничена. Требуется более масштабное статистическое исследование для повышения достоверности наших данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00305).

Список литературы:

1. Ying, J.F. et al. The role of iron homeostasis and iron-mediated ROS in cancer. *Am. J. Cancer Res.* 2021, 11, 1895–1912

2. Тиллиб С.В. Перспективы использования однодоменных антител в биомедицине. *Молекулярная биология* 2020, Т. 54, № 3, 362-373

3. Тиллиб С.В., Горяйнова О.С., Сачко А.М., Иванова Т.И. Высокоаффинные однодоменные антитела для анализа апо- и голотрансферрина человека. *Acta Naturae*. 2022. Т.14. №2, 98-102

Раздел 4. ИНФЕКЦИИ С ВОЗДУШНО-КАПЕЛЬНЫМ, КОНТАКТНО-БЫТОВЫМ МЕХАНИЗМОМ ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЯ И ИХ ОСЛОЖНЕНИЯ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Горина Л.Г.¹, Крылова Н.А.², Раковская И.В.¹, Гамова Н.А.¹, Бархатова О.И.¹

¹ ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Почетного академика Н.Ф. Гамалеи (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»), Москва, Россия.

² ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия.

Введение. В последние годы большое значение уделяется роли инфекционных агентов при бронхиальной астме у детей. Обсуждение роли микоплазм в инфекционной патологии связано с отсутствием характерных клинических симптомов, свойственных только микоплазменной инфекции. Микоплазмы способны колонизировать клетки эпителиальных тканей микроорганизма, адсорбироваться на эритроцитах человека и животных, макрофагах, различных клетках крови. Клетки микоплазм имеют сниженные потенции к росту и размножению *in vitro*, но способны вызывать генерализованную инфекцию с длительной персистенцией в тканях и сыворотке крови. Отсутствие патогномических особенностей при микоплазменной инфекции затрудняет ее клиническую диагностику и увеличивает значение лабораторной диагностики. Также способность *M. pneumoniae* расти в виде биопленки имеет большое значение для понимания причин длительной персистенции *M. pneumoniae* в организме. Большое значение уделяется тактике лечения микоплазменной инфекции при бронхиальной астме. Препаратами выбора для детей первых семи лет жизни являются макролиды — терапия первой линии для лечения инфекций, обусловленных респираторными микоплазмами. Макролиды широко используются в амбулаторных условиях из-за высокой биодоступности при приеме внутрь один раз в день. Однако за последние 10 лет во всем мире отмечена устойчивость микоплазм к макролидам. Особенно в странах Азии, Японии и Китае уровень показателей устойчивости в отдельные годы достигают до 90%. Однако, в то же время стали появляться данные об устойчивости к макролидам, используемых для лечения инфекций, обусловленных микоплазмами, что ставит под сомнение эмпирическую терапию макролидами. Об этом свидетельствуют исследования, проведенные в Соединенных Штатах, указывающие на степень распространения устойчивости к макролидам микоплазм, в частности *M. pneumoniae*. Для объяснения такой устойчивости обычно проводят секвенирование выделенных образцов *M. pneumoniae* в поисках мутаций 23S рРНК, главным образом, в позициях 2063, 2064 и 2617, которые, как правило, вызывают устойчивость к макролидам. Выявление соответствующих однонуклеотидных замен позволяет эффективно предсказать фенотип

устойчивости к макролидам. В исследованиях Раковской И.В. с соавторами (2022) было показано возникновение резистентности к антибиотикам клеток микоплазм, образующих микроколонию. Данные сравнительного полногеномного секвенирования и протеомного анализа клеток классических колоний и микроколоний позволили выявить гены и белки, определяющие изменение морфотипа, физиологических характеристик и антибиотикорезистентности клеток микроколоний. Клетки микроколоний обладают устойчивостью к различным неблагоприятным факторам, вызывающим гибель клеток классических колоний, а также было установлено, что клетки микроколоний резистентны к большинству антибиотиков, обладающим принципиально различными механизмами действия.

Цель и задачи. Выяснение роли микоплазменной инфекции, как триггера обострений бронхиальной астмы (БА) и выбор эффективной антибактериальной терапии.

Материалы и методы. Под наблюдением в Университетской детской клинической больнице КИДЗ им. Н.Ф.Филатова ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова с 2008 по 2020 год находилось 570 детей, больных бронхиальной астмой. В работе использовали *M. hominis* (H-34), *M. pneumoniae* (FH), для идентификации антигенов микоплазм в образцах крови использовали реакцию агрегат-гемагглютинации (РАГА), выявление антигенов микоплазм в ЦИК, проводили методом прямой иммунофлюоресценции (РИФ). Постановку РАГА, РИФ, выделение ЦИК из проб сыворотки крови осуществляли по методикам, описанным ранее. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики ДНК микоплазм проводили с диагностическими наборами ИнтерЛаб-Сервис "АмплиСенсMycoplasma hominis-Eph", АмплиСенсMycoplasma pneumoniae-Eph.

Основные результаты. Так как *M. pneumoniae* является возбудителем респираторного микоплазмоза, а *M. hominis* инфицирует респираторный тракт воздушно-капельным путем, влияние этих видов микоплазм на бронхиальную астму у детей была проведено более детально. У 389 детей (68,2%) были выявлены антигены *M. pneumoniae* и *M. hominis* (один или ассоциация антигенов), у остальных 181 детей (31,8%) эти микоплазмы не были выявлены. При об-

следовании пациентов было показано, что антигены и ДНК *M. pneumoniae* были обнаружены в пробах сыворотки крови в 67,1% и 8,9% случаев соответственно, а *M. hominis* — в 47,3% и 20,5% случаев соответственно. Специфические антигены *M. pneumoniae* в общих ЦИК методом РИФ были обнаружены у 65,8% больных, а *M. hominis* у 59,6% детей. В ЦИК методом ПЦР ДНК *M. pneumoniae* была выявлена у 26,7% пациентов, *M. hominis* — у 42,5%. Полученные данные свидетельствуют о том, что у части больных антигены *M. pneumoniae* и *M. hominis* могут быть в крови не только в виде растворимых молекулярных соединений в свободном состоянии, но и в составе ЦИК. При выявлении микоплазменной инфекции детям назначали три курса лечения азитромицином в дозе 10 мг/кг массы тела по 3 дня с интервалом 4. После проведенного лечения комплексное обследование было проведено повторно у 54 детей. Обследование проводилось через 1,5-3 месяца после окончания терапии. Достоверность различий оценивалась по критерию хи-квадрат (тест Мак Немара). Наблюдалось достоверное снижение показателей определения в РАГА антигенов *M. pneumoniae* и *M. hominis*: так до лечения антигены *M. pneumoniae* выявлялись в 79,6% пациентов, а после лечения — у 29,6%, $p < 0,001$; для *M. hominis* эти показатели составили, соответственно, 68,5% (до лечения) и 34,1% (после лечения), $p < 0,001$. При определении антигенов *M. pneumoniae* и *M. hominis* в ЦИК методом РИФ показатели также значительно улучшились: *M. pneumoniae* до лечения — у 64,8% детей, после лечения — у 29,6% ($p < 0,001$), *M. hominis* соответственно: до лечения — у 70,4%, после лечения — у 22,2% ($p < 0,001$). У пациентов после лечения отмечалось достоверное снижение показателей специфических ДНК в составе ЦИК методом ПЦР: специфические ДНК *M. pneumoniae* были выявлены до ле-

чения — у 31,5% детей, а после лечения — у 11,1% детей ($p < 0,001$), *M. hominis* соответственно: до лечения — у 48,1%, после лечения — у 31,5% детей ($p < 0,003$). Низкие значения ДНК *M. pneumoniae* в сыворотках крови — до лечения 9,3%, после лечения — 5,6%, свидетельствуют о сложности определения микоплазм в крови. Наблюдалось значительное снижение после лечения показателей ДНК клеток *M. hominis* в свободном состоянии (ПЦР): до лечения у 35,2%, после лечения — у 18,5% детей ($p = 0,003$). Для более полного ответа на вопрос, принадлежат ли эти клеточные компоненты микоплазм жизнеспособным клеткам или имеет место только антигенемия и сохранение фрагментов ДНК, изначально попробовали пробы сыворотки крови высевать на питательные среды. Культуральным методом были исследованы 50 проб сыворотки крови, содержащих антигены *M. hominis* и 70 проб, содержащих антигены и *M. pneumoniae*. Из 50 положительных на антиген *M. hominis* проб сыворотки крови культуральным методом было выделено 32 микроколони *M. hominis*. Из 70 положительных проб на антиген *M. pneumoniae* только в 9 случаях удалось выделить микроколони культуральным методом.

Обсуждение / Выводы. Представленные данные свидетельствуют о длительной персистенции антигенов и ДНК клеток микоплазм в свободном состоянии, в составе ЦИК, а также в виде микроколони в крови детей с бронхиальной астмой. Была установлена резистентность микроколони к большинству антибиотиков, используемых для лечения респираторных инфекций. Выявление специфических ЦИК и дифференциация их состава дает ценную информацию о динамике их образования, о наличии связи между их длительной персистенцией с продолжительностью и тяжестью заболевания.

ВЫЯВЛЕНИЕ АССОЦИАЦИЙ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ С ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ ДЕТСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ ОСП «КЛИНИЧЕСКИЙ ГОСПИТАЛЬ ИДК» АО «МЕДИЦИНСКАЯ КОМПАНИЯ ИДК»

Хайретдинова Э.Б.*, Воронова Е.А., Никонорова И.В., Величко Х.А.

АО «Медицинская Компания ИДК», группа компаний «Мать и Дитя», Самара, Россия

Введение. Герпесвирусные инфекции (ГВИ) широко распространены среди населения. Важное свойство герпесвирусов — способность после первичного инфицирования в детском возрасте пожизненно персистировать в организме и реактивироваться под влиянием различных экзо- и эндогенных провоцирующих факторов. ГВИ могут взаимодействовать с другими вирусами, вызывая их активацию, с последующим прогрессированием инфекции. Таким образом, инфицированность ГВИ может оказывать влияние на частоту эпизодов респираторных заболеваний, формируя группу часто болеющих детей и приводя к более тяжелому течению заболеваний.

Цель нашего исследования — выявление возможных ассоциаций ГВИ с острыми респираторными вирусны-

ми инфекциями (ОРВИ) среди пациентов детского стационара ОСП «Клинический Госпиталь ИДК» АО «Медицинская компания ИДК», используя метод полимеразной цепной реакции для обнаружения инфекционного агента.

Материалы и методы. Было проведено ПЦР-исследование на ОРВИ (набор «АмплиСенс®», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ) и ГВИ (наборы реагентов производства АО «Вектор-Бест», РФ) 166 образцов респираторных мазков, взятых в 2022 г. у пациентов в возрасте до 12 лет. Для экстракции ДНК с последующей амплификацией на ГВИ использовали набор «РеалБест ДНК-экспресс» (АО «Вектор-Бест», РФ), а для выделения РНК/ДНК на ОРВИ — комплект реагентов «Рибо-преп» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ). Статисти-

ческую обработку данных выполняли в Medcalc версии 20.

Результаты. Все поступившие пациенты имели отрицательный результат на SARS-CoV-2. У 55% пациентов по результатам лабораторного исследования был установлен диагноз ОРВИ, при этом у 32% была дополнительно выявлена ГВИ. У 28% пациентов с острым респираторным заболеванием не было обнаружено возбудителей ОРВИ и ГВИ. Микст-инфекции наблюдались у 84 пациентов (50,6%), причем в 22 случаях имела место совместная инфекция тремя, в 7 случаях — четырьмя и в 1 случае — пятью возбудителями одновременно. Наиболее часто встречались микст-инфекции вирусом герпеса 6 типа в комбинации с другими патогенными агентами — 63 случая, при этом в виде моноинфекции герпес 6 типа присутствовал лишь у 30 пациентов из 93.

Попарные ассоциации между ГВИ и ОРВИ выявляли путем оценки критерия χ^2 и отношения шансов для парных выборок. Данный анализ позволил выявить выраженные ассоциации ($p < 0,05$ для критерия χ^2 , отношение шансов > 1) вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) с метапневмовирусом (hMpv) и коронавирусом видов HKU-1, OC43; ВГЧ 1 типа с парагриппом 3 генотипа (hPiv-3); цитомегаловируса (ЦМВ) с метапневмовирусом, бокавирусом и парагриппом 3 генотипа. Кроме того, значимые, но более слабые ассо-

циации ($p > 0,05$ для критерия χ^2 , отношение шансов > 1 или $p < 0,05$ при отношении шансов, значимо не отличающемся от 1) установлены для ВГЧ-6 с респираторно-синцитиальным вирусом, аденовирусом (hAdv) групп В, С и Е, риновирусом, парагриппом 3 генотипа и коронавирусом видов E229, NL-63; для ЦМВ с риновирусом; для вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) с респираторно-синцитиальным вирусом, риновирусом и коронавирусом видов, E229, NL-63.

Затем выявленные ассоциации были использованы в анализе логистической регрессии, позволяющем оценить комплексные ассоциации и построить модель связи выбранной инфекции с анализируемыми переменными с оценкой вклада каждой включенной переменной. Для анализа использовали последовательное исключение переменных из модели, критерием исключения являлся уровень значимости $< 0,1$.

Уравнения моделей, полученных посредством логистической регрессии, имеют вид:

$$p = \frac{e^{(C + \sum_i k_i x_i)}}{1 + e^{(C + \sum_i k_i x_i)}} \quad \text{где } C \text{ — константа, } k_i \text{ — коэффициент переменной, } x_i \text{ — значение переменной.}$$

Параметры полученных моделей представлены в таблице.

ТАБЛИЦА. ПАРАМЕТРЫ МОДЕЛЕЙ АССОЦИАЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ ЛОГИСТИЧЕСКОЙ РЕГРЕССИИ.

Переменная	Коэффициент	Стандартная ошибка	P	Отношение шансов
ВГЧ-6: для модели в целом P < 0,0001, ППК = 0,666 (95% ДИ 0,610 — 0,720)				
$p = \frac{e^{(-1,197 + 1,101hAdv + 1,564hMpv + 1,555BЭБ + 0,928ЦМВ)}}{1 + e^{(-1,197 + 1,101hAdv + 1,564hMpv + 1,555BЭБ + 0,928ЦМВ)}}$				
hAdv	1,10065	0,56377	0,0509	3,01 (1,00 — 9,08)
hMpv	1,56404	0,87640	0,0743	4,78 (0,86 — 26,62)
ВЭБ	1,55539	0,46519	0,0008	4,74 (1,90 — 11,79)
ЦМВ	0,92755	0,34760	0,0076	2,53 (1,28 — 5,00)
Константа	-1,19656	0,15672	<0,0001	
ЦМВ: для модели в целом P = 0,0002, ППК = 0,658 (95% ДИ 0,601 — 0,712)				
$p = \frac{e^{(-1,197 + 1,737hPiv-3 + 0,963BГЧ-6)}}{1 + e^{(-1,197 + 1,737hPiv-3 + 0,963BГЧ-6)}}$				
hPiv-3	1,73730	0,61947	0,0050	5,68 (1,69 — 19,13)
ВГЧ-6	0,96346	0,33620	0,0042	2,62 (1,36 — 5,07)
Константа	-1,19656	0,15672	<0,0001	
ВЭБ: для модели в целом P = 0,0002, ППК = 0,694 (95% ДИ 0,638 — 0,746)				
$p = \frac{e^{(-1,197 + 1,737hPiv-3 + 0,963BГЧ-6)}}{1 + e^{(-1,197 + 1,737hPiv-3 + 0,963BГЧ-6)}}$				
ВГЧ-6	1,64265	0,45333	0,0003	5,17 (2,13 — 12,57)
Константа	-3,21386	0,36059	<0,0001	

ППК — площадь под ROC-кривой, ДИ — доверительный интервал.

Результаты логистической регрессии в целом подтверждают ассоциации, выявленные на предыдущем этапе. Наиболее выраженные ассоциации характерны для ЦМВ и парагриппа 3 генотипа, а также для ВГЧ-6 и ВЭБ. Значимость ассоциаций ВГЧ-6 с коронавирусом видов HKU-1, OC43; ВГЧ-1 с парагриппом 3 генотипа; ЦМВ с метапневмовирусом и бокавирусом и всех слабых ранее выявленных ассоциаций оказалась недостаточной для включения в комплексные модели, однако их также сле-

дует учитывать в плане возможных осложнений в реальной клинической практике.

Выводы. На основе полученных данных можно сделать вывод о необходимости диагностики на ГВИ для пациентов детского возраста при подозрении на острую респираторную вирусную инфекцию для прогнозирования течения заболевания и снижения риска осложнений, в особенности у часто болеющих детей и лиц с ослабленным иммунитетом.

НАПРЯЖЕННОСТЬ ИММУНИТЕТА К КОРИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ СКРИНИНГА В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ

Григорьева Т.Д.¹, Белопольская М.А.^{1,2}, Потанина Д.В.¹, Дмитриев А.В.², Яковлев А.А.¹

¹ Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность: По данным ВОЗ в мире в 2019 году зарегистрировано 413 308 подтвержденных случаев кори (по состоянию на 5 ноября 2019 г.), что на 26% больше, чем в 2018 году. Фактическое число случаев заболевания, согласно общемировым оценочным показателям, превышает число официально зарегистрированных случаев. Во всем мире, по оценкам ВОЗ, регистрируется менее 1 из 10 случаев заболевания, причем данные разнятся от региона к региону. В Европейском регионе за десять месяцев 2019 года зарегистрировано 101 280 случаев кори. Несмотря на наличие плановой вакцинации от кори, внесенной в прививочные календари большинства стран, распространение этого заболевания в настоящее время остановить не удастся. Основная причина этого — недостаточный охват вакцинацией и снижение популяционного иммунитета. Известно, что при снижении популяционного иммунитета ниже 95%, существует риск развития вспышки заболевания. При отсутствии своевременных и комплексных мер реагирования вирус начинает распространяться по территории затронутой страны и за ее пределы, все шире поражая не защищенные от него группы населения.

Цель работы: Определить наличие антител класса IgG к кори в различных возрастных группах.

Материалы и методы: В поликлиническом отделении клинической инфекционной больницы им. С.П. Боткина в 2019 году были обследованы 518 человек, средний возраст которых составил $45,05 \pm 1,44$ лет. Методом ИФА определялись антитела к кори класса IgG, была использована тест-система «Векто Кори IgG», Россия. Результат IgG от 0,18 МЕ/мл и более считался положительным. Все обследуемые были разделены на следующие возрастные группы: группа 1 — 18–25 лет (n=87), группа 2 — 26–35 лет (n=92), группа 3 — 36–45 лет (n=101), группа 4 — 46–55 лет (n=79), группа 5 — старше 56 лет (n=159).

Результаты: по результатам обследования (см. таблицу) число серопозитивных по IgG к кори минимально в возрастной группе 18–25 лет, с увеличением возраста обследуемых их количество увеличивается. При анализе всех возрастных групп итоговое число серопозитивных лиц по IgG к кори составляет всего 76,3%, что значительно ниже рекомендуемого ВОЗ безопасного значения популяционного иммунитета.

Возраст, лет	Обследовано, человек	Обнаружено, IgG к кори	
		абс. число	%
18-25	87	38	43,7
26-35	92	64	69,6
36-45	101	77	76,3
46-55	79	65	82,3
56 и старше	159	151	94,9
ИТОГО	518	395	76,3

Выводы: Выявленные различия в количестве серопозитивных по IgG к кори лиц в зависимости от возраста могут быть связаны с сохранением естественного иммуни-

тета в старшей возрастной группе в связи с перенесенной инфекцией, а также с недостаточным охватом двукратной вакцинацией лиц молодого возраста.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ SARS-COV-2 В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ

Резник В.И., Савосина Л.В., Лебедева Л.А., Жалейко З.П.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае», Хабаровск, Россия

Введение. Респираторно-синцициальная вирусная инфекция (РСВИ) в структуре возбудителей ОРВИ занимает существенное место, поражая как детей, так и взрослых. В последние два года — 2021 и 2022 гг. в Хабаровском крае лабораторное выявление РСВИ выросло более, чем в 2 раза по сравнению с 2020 годом.

Задачи исследования. Используя объективный метод лабораторной диагностики провести комплексный этиологический и эпидемиологический анализ РСВИ за последние три года на территории Хабаровского края.

Материалы и методы. Вирусологическая лаборатория ФБУЗ «ЦГиЭ в Хабаровском крае» проводит еженедельный мониторинг респираторных заболеваний для установления их этиологии. В 2020 году обследовано 2603 случая, в 2021 г. — 2544, в 2022 г. — 4790. Выявление ДНК/РНК возбудителей проводили с использованием наборов производства ООО «ИЛС», ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, АО «Вектор Бест». Определяли специфические последовательности следующих возбудителей: вирусов гриппа *A/H1N1/pdm09/*, *A/H3N2/*, *B*, парагриппа I-IV серотипов, РС-вируса, аденовируса, риновируса, метапневмовируса, коронавируса, бокавируса; бактерий — *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, и внутриклеточных паразитов — *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*. Материалом для исследования служили пробы клинического материала — носоглоточные мазки и, в эпизодических случаях, мокрота; материал отбирался у больных с респираторными диагнозами.

Результаты и обсуждение. Годовая динамика заболеваемости РСВИ резко выросла в последние два года: в 2020 году РСВИ диагностирована у больных респираторными заболеваниями 2,9%, в 2021г. — 6,6%, в 2022г. — 5,1%. Среди клинических форм РСВИ имелись различия. Так у больных с диагнозом ОРВИ в 2020 году РСВИ выявлена в 3,2% (1837 обследованных), в 2021г. — в 8,1%

(1377 обследованных), в 2022г. — в 2,3% (от 2281 обследованного). При клиническом диагнозе «внебольничная пневмония», в 2020г. РСВИ составила 2,2% (766 обследованных); 2021г. — 4,8% (1167 обследованных), в 2022г. — 7,6% (2509 обследованных). При сравнении удельного веса клинических форм РСВИ выявлены следующие различия: в 2020 и 2021гг. ОРВИ составили 77,6% и 64,9%; а пневмонии развились у 22,4% и 35,3% заболевших соответственно. В 2022 году резко возрос удельный вес пневмоний — 78,6%, а ОРВИ в этом году составили 21,4%. Удельный вес РСВИ среди всех выявленных вирусных возбудителей в 2020 году составил 5,7%, а в 2021 этот показатель вырос до 14,4%, в 2022 — до 12,4%.

Сезонность РСВИ за последние два года (2021 и 2022гг.) была зимне-весенняя: средний процент выявления инфицированных за эти годы составил: I кв. — 6,5%; II кв. — 9,6%; III кв. — 0,2%; IV кв. — 5,1%.

Возрастная структура РСВИ за анализируемые годы была сходной, поэтому мы приводим сводные показатели за три года. Дети от 0 до 2-х лет по удельному весу инфицировались в 65,9% случаев; от 3-х до 6 лет — 25,3%; 7-14 лет — 4,5%, взрослые — 15 и старше — 4,3%. Провели аналогичные сравнения возрастной структуры для вирусов гриппа и Sars-CoV-2 — таблица 1. Для РСВИ наибольшая пораженность была среди детей младшего возраста, а с увеличением возраста линейно уменьшалась инфицирование РС вирусами. Дети составили 95,75% всех лабораторно выявленных случаев РС-инфекции. Для гриппа пораженность детей 15 лет была лишь на 10%, выше чем взрослых. Показатели инфицированности вирусом Sars-CoV-2 в эти три года резко отличалось в возрастном разрезе от РС и гриппа. Дети составили по удельному весу 14,5% инфицированных, взрослые — 85,5%, причем лица старше 65 лет составили 26,0%.

ТАБЛИЦА 1. ВОЗРАСТНАЯ СТРУКТУРА РС, ГРИППА И SARS-COV-2 ИНФЕКЦИЙ У БОЛЬНЫХ ОРЗ В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ В 2020, 2021 2022ГГ.

Возбудители		РС	грипп	Sars-CoV-2
Положительные	абс.	487	849	1290
	%	100,0	100,0	100,0
из них удельный вес % возрастных групп	0-2г.	65,9	13,1	4,5
	3-6л.	25,3	20,1	2,6
	7-14л.	4,5	25,7	7,4
	Всего дети	95,7	58,9	14,5
	15 и >	4,3	41,1	85,5

Проведен анализ частоты микст-инфицирования РС-вирусом и другими возбудителями ОРЗ. Одновременное обнаружение РС-вируса и Sars-CoV-2 установлено в 4-х случаях, причем у двух заболевших с диагнозом «пневмония», кроме этих двух вирусов выявлено инфицирование бактериальными патогенами. Сочетание инфицирования РС-вируса с другими вирусами выявлено в 2020г. в одном случае, в 2021г. — в 23-х, в 2022г. — в 12. Из этих 36 вирусно-вирусных микст-инфекций у 19 пациентов клинически диагностирована ОРВИ, а у 17 — пневмония. Вирусно-бактериальные (РС + бактерии) микст-инфекции выявлены у 143 заболевших: 29 случаев в 2021г.

и 114 в 2022г. Все эти пациенты перенесли пневмонию. Кроме выше приведенных данных в 19 случаях выявлялись сочетания РС-вируса одновременно с каким-либо вирусным возбудителем и бактериальным патогеном.

Заключение. В 2021 и 2022гг. в Хабаровском крае выявлено значительное увеличение заболеваний РСВИ. Характер эпидпроцесса был типичным для данной инфекции: зимне-весенняя сезонность, поражаемость лиц детского возраста, существенное количество случаев осложнения — поражение нижних дыхательных путей с клиникой пневмонии. Среди этих пациентов установлено наличие микст-инфекций.

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Шевякова Е.А., Зыкова Т.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Инфекционные осложнения являются неотъемлемой составляющей современной противоопухолевой терапии и характеризуются широким спектром возбудителей, включая бактерии, грибы, вирусы.

Целью настоящего исследования было ретроспективное определение этиологической структуры респираторных вирусных инфекций у онкологических больных на фоне проведения противоопухолевой терапии.

Материал и методы. В период с 2017 г. по апрель 2020 г. обследовано 167 образцов от 144 онкологических больных с клиническими проявлениями респираторных инфекций, из них 50 детей (6,9±5,7 лет), 94 взрослых (50,7±15,6 лет). Исследовали назофарингеальные мазки, мокроту, трахеобронхиальный аспират. Выделение НК возбудителей выполняли с помощью комплекта «Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ). Все образцы обследовали на наличие РНК респираторно-синциального вируса (*hRSv*), метапневмовируса (*hMPv*), вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (*hPIV*), коронавирусов видов OC43, E229, NL63, HKU1 (*hCov*), риновирусов (*hRv*), ДНК аденовирусов групп В, С и Е (*hAdv*) и бокавируса (*hBov*) методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием набора «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИЭ). Из них 98 образцов от 80 людей также были обследованы на наличие РНК вируса гриппа А и гриппа В с использованием набора «АмплиСенс *Influenza virus A/B-FL*» (ФБУН ЦНИИЭ).

Результаты и обсуждение. Всего за период с 2017 по 2020 г. частота выявления возбудителей ОРВИ составила 31,3% (45/144), из них 22,2% (10/45) регистрировались в виде микст-инфекции, 77,8% (35/45) — моноинфекции. Отмечено явное преобладание *hRv* (14,6%, 21/144), вторым по частоте оказался *hRSv* (6,3%, 9/144), по 2,1% (3/144) пришлось на *hPIV-3* и грипп А, грипп В выявлялся реже (2,8%, 4/144). С равной частотой были выявлены *hBov*, *hMPv* и *hAdv* (по 2,1%, 3/144), а также сезонные *hCov*: NL-63/229E и HKU-1/OC 43 по 0,7% (1/144).

Было проанализировано три эпидемических сезона, которые отличались по частоте распространенности вирусных инфекций. Так, в сезон 2017–2018 г.г. возбудители обнаруживались у 15,6% (10/64), в т. ч. у 26,7% (4/15) среди детей, у 12,2% (6/49) среди взрослых пациентов. В сезоне 2018–2019 г.г. вирусы регистрировались вдвое чаще, у 36,0% (9/25): у 50,0% (6/12) среди детей, но только у 4,8% (3/13) среди взрослых. Максимальная частота инфицирования была отмечена в 2019–2020 г.г. — у 47,3% (26 из 55): у 56,5% (13/23) среди детей и у 40,6% (13/32).

Отличался в зависимости от сезона и спектр обнаруженных возбудителей. В сезон 2017–2018 г.г. преобладал *hRv* — у 10,9% (7/64), причем как у детей (26,7%, 4/15), так и у взрослых (6,1%, 3/49). Помимо этого, у детей также выявлялся *hBov* (6,7%, 1/15), а у взрослых — *hRSv* (4,1%, 2/49) и *hMPv* (2,0%, 1/49). Наличие микст-инфекции (*hRv*+ *hBov*) было отмечено только у детей (25,0% от числа положительных, 1/4).

В сезоне 2018–2019 г.г. чаще регистрировался грипп А — у 20,0% (5/25). У детей этот возбудитель выявлялся чаще прочих — у 25,0% (3/12), в равной степени обнаруживались *hRSv* и *hRv*, по 16,7% каждый (по 2/12). При этом у 50,0% от числа положительных (3/6) наблюдалось инфицирование одним возбудителем, и у 50,0% (3/6) наблюдалось их сочетание (грипп А + *hRSv*, *hRv* + *hCov* (HKU-1, OC 43), *hRSv* + *hCov* (NL-63, 229E)). У взрослых грипп А и *hRv* выявлялись с одинаковой частотой, по 15,4% каждый (по 2/13), во всех случаях — в виде моноинфекции.

В сезон 2019–2020 г.г. как и в 2017–2018 г.г., в этиологической структуре заболеваемости ОРВИ преобладал *hRv*, выявленный в 18,2% (10/55) случаев. Причем данный возбудитель был обнаружен чаще прочих как среди детей (21,7%, 5/23), так и среди взрослых (18,2%, 10/55). Вторым по распространенности среди детей стал

вирус гриппа В (17,4%, 4/23), реже обнаруживались *hAdv* (13,0%, 3/23), *hRSv* (8,7%, 2/23), *hBov* и *hPiv-3* (по 4,3%, 1/23 каждый). В 23,1% случаев от числа положительных (3/13) возбудители регистрировались в таких ассоциациях, как *hRv+hBov*, *hRSv + hRv*, *hAdv + hRv*.

У взрослых пациентов грипп В выявлен не был, вторым по частоте выявления стал *hPiv-3* (12,5%, 4/32), далее — *hRSv* (9,4%, 3/32), отсутствовавший у детей *hMpv* (6,3%, 2/32), реже остальных выделялся *hBov* (3,1%, 1/32). Микст-инфицирование наблюдалось у взрослых реже, чем у детей, — в 15,3% случаев от числа положитель-

ных (2/13), и это были сочетания *hPiv-3* с *hMpv* или с *hRv*.

Выводы. За период наблюдения в структуре заболеваемости респираторными инфекциями, возникшими на фоне проведения противоопухолевой терапии, вирусная этиология была подтверждена у 31,0%. Частота распространения респираторных вирусов отличалась как в разные эпидемические сезоны, так и в зависимости от возраста. Спектр выявленных возбудителей также отличался между сезонами и соответствовал возбудителям, циркулирующим в соответствующий эпидемический сезон в популяции.

ИЗУЧЕНИЕ КОНСЕРВАТИВНЫХ И ВАРИАБЕЛЬНЫХ ЭПИТОПОВ В МОЛЕКУЛЕ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСОВ ГРИППА В С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Сорокин Е.В., Царёва Т.Р., Кривицкая В.З., Петрова Е.Р., Грудинин М.П.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Грипп является одним из наиболее значимых инфекционных заболеваний во всем мире. Традиционно большинство сообщений о гриппе сосредоточено на гриппе А, несмотря на то, что грипп В оказывает большое влияние на общественное здравоохранение и ассоциируется, в частности, с тяжелыми заболеваниями как у детей, так и у взрослых. Непрерывная эволюция вирусов гриппа В привела к значительным изменениям консервативных эпитопов современных вирусов по сравнению с донором аттенуации В/Ann Arbor/1/1966 для живых гриппозных вакцин. Было показано, что в качестве альтернативного донора аттенуации можно успешно использовать штамм В/Брисбен/60/08, так как аминокислотные последовательности его внутренних белков более точно соответствует современным циркулирующим вирусам гриппа В.

В связи с вышеизложенным исследование антигенной структуры нуклеопротеина вирусов гриппа В является актуальной научно-исследовательской задачей и имеет не только теоретическую значимость, но важно и с практической точки зрения. Результаты исследования могут быть использованы при разработке диагностических тест-систем, изучении и отборе вакцинных штаммов вирусов гриппа В.

В лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева были получены 22 гибридомы — продуценты моноклональных антител (МКА) к вирусу гриппа В. Изучение направленности МКА методом иммуноблоттинга после электрофореза в нередуцирующих и редуцирующих условиях показало, что все МКА взаимодействовали с белком с молекулярной массой 62-64 кДа, что соответствует нуклеопротеину вирусов гриппа В.

Все МКА были протестированы в микрокультуральном ИФА с набором штаммов разных лет выделения, включая штаммы ранних лет выделения и штаммы, относящиеся к обеим эволюционным линиям. Тестирование показало, что МКА 6Е3, 4Г6, 7В12, 7Е9, 2/3, 1Г8, 1Д9,

4Д11 и 1F2 взаимодействовали со всеми исследованными штаммами. МКА 6Г1, 8С2, 10А5, 10В8, 10Е5, 10Е10, 10Е11, 1Е11, 6Д9, 7Е9 и 5С10 взаимодействовали с большинством из современных протестированных штаммов, но при этом МКА не проявляли активности в отношении изолятов 1940-1969 гг. выделения. Большой интерес представляли МКА 8А1. Данные МКА взаимодействовали со штаммами ранних лет выделения (1940-1959 гг.), не реагировали со многими штаммами Ямагатской линии и показали высокий уровень гетерогенности по спектру взаимодействия с вирусами гриппа В Викторианской линии генетической группы V1А. При этом МКА 8А1 показали высокий уровень активности в отношении вирусов Викторианской линии генетических групп V1А Δ162-163 и V1А Δ162-164.

Для картирования нуклеопротеина методом конкурентного ИФА были получены конъюгаты NP-специфичных МКА с пероксидазой хрена. Картирование нуклеопротеина проводили методом конкурентного ингибирования МКА, меченных и немеченных пероксидазой хрена с вирусом гриппа В/Брисбен/46/15. Результаты конкурентного ингибирования МКА, меченных и немеченных пероксидазой хрена, показали, что по своей антигенной направленности полученные МКА можно разделить на 7 групп:

1. Сайт взаимодействия МКА 6Г1 в достаточной степени (на 65-70%) перекрывает сайт связывания МКА 2А8, 2Г6 и 8С2 (группа 2).
2. Большая и достаточно гетерогенная группа МКА (6Е3, 2Г6, 4Г6, 7В12, 2А8, 8С2, 10А5, 10В8, 10Е5, 10Е10, 10Е11).
3. Сайт связывания МКА 7Е9 частично перекрывается с 6Д9 и 5С10. При этом, сайт связывания МКА 7Е9 не перекрывается с МКА 2-ой группы. Сайты связывания для МКА 6Д9 и 5С10 частично перекрываются с сайтами для МКА, относящимся ко 2-ой группе (МКА 4Г6, 7В12, 10В8).
4. МКА 2/3 и 1Г8 направлены к одному и тому же эпитопу, поскольку степень конкуренции за место связывания

на молекуле NP- белка более 90% и данные МКА не имеют общего сайта взаимодействия с другими МКА.

5. МКА 1D9 и 4D11 направлены к одному и тому же эпитопу, поскольку степень конкуренции за место связывания на молекуле NP- белка более 80% и данные МКА не имеют общего сайта взаимодействия с другими МКА.

6. Сайт взаимодействия МКА 1F2 не имеет общих детерминант с сайтами связывания всех остальных МКА.

7. Сайт взаимодействия МКА 8A1 не имеет общих детерминант с сайтами связывания всех остальных МКА.

Показано, что проанализированные МКА, предположительно, направлены как минимум к 7 эпитопам нуклеопротеина вируса гриппа В, при этом МКА направлены к 4 независимым и 3 частично перекрывающимся антигенным сайтам. Схематично результаты картирования нуклеопротеина вируса гриппа В с использованием моноклональных антител представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. СХЕМАТИЧНОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КАРТИРОВАНИЯ NP ВИРУСА ГРИППА В С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МКА

Группы МКА									
1	2			3	4	5	6	7	
6G1	2A8 2G6 8C2	10E5 10E11 10E10 1E11 6E3 10A5	4G6 7B12 10B8 2G6 8C2	6D9 5C10	7E9	1F2	1D9 4D11	2/3 1G8	8A1

Серым цветом показано перекрывание антигенных областей МКА 6G1 (группа 1) и МКА 2A8, 2G6 и 8C2 (группа 2); серым цветом показано перекрывание антигенных областей МКА 4G6, 7B12, 10B8, 2G6, 8C2 (группа 2) и МКА 6D9, 5C10 (группа 3).

Таким образом, анализ полученных МКА в микрокультуральном ИФА с набором штаммов вирусов гриппа В разных лет выделения (1940-2022 гг.) показал наличие как высококонсервативных так и изменчивых эпитопов в NP-белке вирусов гриппа В. По данным микрокультурального ИФА установлено, что ряд МКА направлен к консервативным эпитопам молекулы NP. При этом выявлена высокая гетерогенность молекулы NP вирусов гриппа В по

характеру взаимодействия с другими МКА

Картирование антигенной структуры нуклеопротеина вируса гриппа В с использованием МКА методом конкурентного ИФА показало наличие как минимум семи иммунодоминантных сайтов в составе данного белка. Показано, что три антигенные области частично перекрываются, тогда как другие четыре, с которыми взаимодействуют МКА, не имели общих антигенных детерминант.

Универсальные МКА 6E3, 4G6, 7B12, 7E9, 1G8, 1D9, 4D11 и 1F2, которые взаимодействовали со всеми исследованными штаммами, отобраны для дальнейших исследований как перспективные для конструирования современных диагностических систем.

ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ У БОЛЬНЫХ КОРЬЮ

Малеев В.В.¹, Алешина Н.И.¹, Лазарева Е.Н.¹, Астрина О.С.¹, Наврузова Л.Н.¹, Краснова С.В.², Цветкова Н.А.², Вдовина Е. Т.²

¹ ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора РФ, г. Москва, Россия;

² ГБУЗ ИКБ №2 ДЗМ, г. Москва, Россия

Введение. Для современного течения кори характерны не только ее контагиозность, но и высокий риск возникновения осложнений, связанных с нарушениями гемостаза, которые определяют исход болезни. В связи с этим, для предотвращения возможности возникновения сосудистых нарушений у пациентов с коморбидностью необходимо углубленное исследование состояния эндотелия.

Цель и задачи. Исследовать активность маркеров повреждения эндотелия микроциркуляторного русла у больных корью.

Материалы и методы. На базах ГБУЗ ИКБ№2 ДЗМ и клинического отдела инфекционной патологии ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора РФ за период с 2018 — 2019 г., где было обследовано 78 больных с диагнозом корь, верифицированным методом ИФА. Средний возраст пациентов 39 лет, 36 женщин и 42 мужчины. Больные поступали в период разгара на 2 день появления высыпаний.

Количественное определение эндотелина (ЭТ) и тромбомодулина (CD141) в сыворотке крови проводили методом ИФА на приборе Anthos 2010 наборами: Эндо-

телин 1-38-«Biomedica immunoassays» (Австрия), Тромбомодулин-«HycultBiotech» (Нидерланды). Активность фактора Виллебранда (VWF) определяли в плазме крови мануальным методом на реактивах: Виллебранд-тест НПО «Ренам».

Контрольную группу составили 20 здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу группе сравнения.

Результаты. В период разгара на 6 день болезни отмечалось значительное повышение концентрации ЭТ до 3,1 пм/л (контроль 0,34±0,05 пм/л), что свидетельствовало о возможности проявления вазоконстрикции, результатом которой могут быть изменения реологии крови. CD 141 является интегральным мембранным белком, участвующим в процессе активации протеина с тромбином с исключением последнего из тромбообразования. В данном исследовании было выявлено резкое его снижение до 485

пг/мл в сравнении с контрольной группой (3280 ± 234 пг/мл); при этом активность VWF была увеличена более чем в 2 раза (контроль 61,12±5,69%), указывая на значительное повреждение эндотелия, вызванное усиленной продукцией биологически активных веществ под влиянием инфекционного агента.

Заключение. Таким образом, выявленное повышение концентрации эндотелина и фактора Виллебранда, характеризующие состояние эндотелия микроциркуляторного русла у больных корью, компенсируется снижением тромбомодулина, что обуславливает развитие вазоконстрикции, которая граничит с риском повышенного тромбообразования. Изучение данных показателей является значимым для оценки тяжести течения, прогн оза и выбора фармакотерапии больных корью с целью предупреждения тромбогеморрагических осложнений.

ГЕНОВАРИАНТЫ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР: СВЯЗЬ С КЛИНИЧЕСКИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА У ДЕТЕЙ

Попкова М.И.¹, Уткин О.В.¹, Филатова Е.Н.¹, Брызгалова Д.А.¹, Соболева Е.А.², Сахарнов Н.А.¹

¹ ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

² ГБУЗ НО «Нижегородский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Нижний Новгород, Россия

Введение. Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) — широко распространенный во всем мире представитель семейства *Herpesviridae*. Геном ВЭБ представлен линейной двуцепочечной ДНК размером около 172 000 п.н.. Данные зарубежных исследователей убедительно демонстрируют выраженную гетерогенность популяции ВЭБ, как в масштабах отдельных географических регионов мира, так и в изолятах от одного инфицированного индивида. Несколько десятилетий для оценки генетического разнообразия ВЭБ исследователи применяют подходы, основанные на анализе вариабельности последовательностей отдельных генов/белков вируса или их участков. Как следствие, предложено множество авторских классификаций ВЭБ. Основной классификацией остается разделение вируса на два типа — ВЭБ-1 и ВЭБ-2 (на основе последовательностей генов ядерного антигена вируса: *EBNA-2* и *EBNA-3A*, *-3B*, *-3C*). Однако внимание зарубежных и российских исследователей сосредоточилось на изучении структурно-функционального полиморфизма наиболее вариабельного участка генома ВЭБ — гена латентного мембранного протеина 1 (*LMP-1*) и кодируемого им одноименного онкобелка, в контексте поиска геновариантов вируса высокого онкогенного риска. Преимущественно использовалась наиболее популярная классификация вариантов ВЭБ по R. Edwards и соавт. (1999), основанная на характерных аминокислотных (а.к.) паттернах С-концевой области *LMP-1*. При этом вопросу изучения молекулярно-генетической характеристики вируса при ВЭБ-инфекции у детей уделяется недостаточно внимания. Оценка клинической значимости генетического разноо-

бразия ВЭБ при инфекционном мононуклеозе (ИМ), как широко распространенной в РФ детской инфекции, до сих пор не проводилась.

Цель исследования — оценить взаимосвязь молекулярно-генетических вариантов *LMP-1* ВЭБ с клинико-лабораторными проявлениями ИМ у детей.

Материалы и методы. Исследовано 132 изолята ВЭБ из лейкоцитов крови и слюны 69 детей в возрасте 1-17 лет с диагнозом «инфекционный мононуклеоз, вызванный ВЭБ», проживающих в Нижегородской области. Раздельная детекция ВЭБ-1/ВЭБ-2 и амплификация С-концевого фрагмента гена *LMP-1* выполнены с помощью оптимизированных нами лабораторных протоколов однораундовой ПЦР. Секвенирование по Сэнгеру фрагмента гена *LMP-1* осуществлялось на генетическом анализаторе AB-3500 genetic analyzer («Applied Biosystems», США). Биоинформационный анализ данных проведен с помощью открытого программного обеспечения MEGA X (Mega Software, США). Для оценки комплекса анализируемых клинико-лабораторных признаков и их взаимосвязи с установленными геновариантами ВЭБ применен многофакторный анализ (МФА), в частности, метод главных компонент. Статистический анализ выполнен на основе свободно распространенных языка программирования R и среды RStudio.

Основные результаты. По результатам типирования ВЭБ на основе гена *EBNA-2* была выявлена принадлежность всех полученных изолятов только к одному типу вируса — ВЭБ-1. Сравнительный анализ с данными немногочисленных зарубежных публикаций подтвердил,

что ИМ чаще был ассоциирован с типом ВЭБ-1. Установлено, что клиническая картина анализируемых нами случаев заболевания соответствовала типичному течению ВЭБ-ИМ у детей, включая такие ведущие синдромы как лихорадка, интоксикация, лимфаденопатия, гепатоспленосегалия, поражение рото- и носоглотки. Несмотря на то, что все случаи ВЭБ-ИМ по данным медицинской документации были отнесены к средней степени тяжести, выраженность проявлений отдельных клинико-лабораторных признаков у каждого пациента существенно варьировала. Результаты последующей оценки молекулярно-генетического разнообразия С-концевой области *LMP-1* значительно расширили представления о генетической гетерогенности вируса (ВЭБ-1). Выявлено четыре из семи охарактеризованных R. Edwards и соавт. вариантов *LMP-1*: B95-8 (60,6%), *China 1* (16,7%), NC (16,7%), *Med-* (4,5%) и коинфицирование B95-8+*China 1* (1,5%). Кроме того, проведенный нами детальный анализ аминокислотных последовательностей позволил выявить широкий спектр мутаций С-концевой области *LMP-1* относительно референсного штамма B95-8 (GenBank: V01555.2), включая 3 варианта делеций, 59 аминокислотных замен в 46 локусах, а также вариативность тандемных повторов от 3,5 до 7.

По разработанному нами алгоритму была проведена оценка взаимосвязи выявленных молекулярно-генетических характеристик ВЭБ-1 с особенностями проявлений ИМ у детей. МФА показал, что в контексте первой главной компоненты возраст пациента оказывает влияние преимущественно на степень выраженности цитолитического синдрома, в то время как анализ второй главной компоненты указывает на то, что различные варианты *LMP-1* детерминируют разную выраженность синдрома интоксикации, а на уровне отдельных признаков значимым являлось увеличение лимфоузлов, беспокойство, отечность лица, снижение аппетита, нарушение сна, вялость, увеличение селезенки, изменение концен-

трации гемоглобина, глюкозы и количества моноцитов. Установлено, что у пациентов, инфицированных вариантом *LMP-1 B95-8*, ВЭБ-ИМ протекает легче и с наименее выраженным синдромом интоксикации. Инфицирование вариантом *Med-* и субвариантами, несущими аминокислотные замены L338S и S229T, было ассоциировано с более тяжелыми случаями заболевания, доля которых суммарно составила 24,6% (каждый четвертый из госпитализированных детей). Мутация L338S (присутствует в 100% штаммов *China 1* и *Med-*) к тому же была связана с более выраженными проявлениями синдрома интоксикации. Случаи инфицирования субвариантом ВЭБ, несущим мутацию S229T (встречалась в штаммах *Med-* и NC), отличались наибольшей вирусной нагрузкой в лейкоцитах крови.

Заключение. Впервые в РФ дана оценка молекулярно-генетического разнообразия ВЭБ и его клинической значимости при ИМ у детей. Полученные результаты типирования ВЭБ свидетельствуют о доминировании ВЭБ-1 в этиологии ИМ у детей, проживающих в Нижегородской области (географически относится к территории Европейской части России). Показано, что особенности клинико-лабораторных проявлений ВЭБ-ИМ у детей могут зависеть от молекулярно-генетических характеристик вируса. При этом отдельные типичные признаки заболевания и степень их выраженности ассоциированы с конкретным вариантом или субвариантом *LMP-1*. Важным аспектом является изучение функциональных свойств мутаций L338S и S229T, которые до сих пор остаются не охарактеризованными. Полученные результаты имеют важную практическую направленность, позволяя выявлять группы риска в зависимости от особенностей течения заболевания при инфицировании различными вариантами ВЭБ, а также с точки зрения оптимизации и индивидуализации ведения пациентов, перспективной разработки средств специфической профилактики и терапии ВЭБ-инфекции.

ЭТИОЛОГИЯ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ НАСЕЛЕНИЯ Г. НОВЫЙ УРЕНГОЙ

Черемных Н.В.

ГБУЗ ЯНАО «Новоуренгойская ЦГБ», г.Новый Уренгой, ЯНАО, Россия.

Этиологическая расшифровка респираторных инфекций является неотъемлемой частью проведения и совершенствования противоэпидемических мероприятий, совершенствование методов и средств специфической и специфической профилактики, особенно среди уязвимых групп населения, снижение экономического и социального ущерба в целом.

Цель исследования: изучить этиологию острых респираторных инфекций среди населения г. Новый Уренгой.

Материалы и методы: за период 2019-2022гг исследовано 6860 проб мазков из носа и ротоглотки

больных гриппом и 8098 больных ОРВИ. Исследование проводилось методом ПЦР. Выделение РНК проводили с использованием наборов реагентов ООО ИнтерЛабСервис «РИБО-преп» или с помощью реагентов на полуавтоматической станции выделения нуклеиновых кислот KingFisher, реагенты «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL», «АмплиСенс Influenza virus A/H1-swine-FL», «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL», предназначенный для выявления и дифференциации возбудителей ОРВИ (респираторно-синцитиальный вирус (RSV), метапневмовирус (MPV), вирусы парагриппа тип 1-4 (PIV), коронавирусы 229E, OC43, HKU1, NL63 (CoV),

риновирусы А, В, С (Rv), бокавирус (Bov), аденовирусы В, С, Е (Adv). Использовались официальные данные информационных бюллетеней по инфекционной и паразитарной заболеваемости ФБУЗ “Центр гигиены и эпидемиологии в ЯНАО в г. Новый Уренгой, Тазовском районе в исследуемые периоды.

Результаты исследования. В 2019 г. в ФБУЗ ЯНАО НЦГБ внедрено исследование методом ПЦР материала на определение РНК вирусов гриппа и ОРВИ. При анализе заболеваемости ОРВИ и гриппа отмечается тенденция к росту в анализируемых эпидемических сезонах. Так в период 2019-2022г зарегистрировано 230899 случаев ОРВИ. Показатель заболеваемости ОРВИ на 100 тыс. населения в 2019 г. составил 27565,8 против 69511,9 в 2022 г. Соответственно увеличилось количество поступающего материала на исследование. В 2019г-1040 проб, против 3713 проб в 2022г. Выявление РНК вирусов ОРВИ составило 22,5% в 2019г против 26,8% в 2022г. В этиологической структуре преобладали респираторно-синциальный вирус 4,7-6,2%, риновирус — 6,3-8,2%. Вирусы парагриппа 1-4 типа составили 0,1-3,4%. По данным ФБУЗ “Центр гигиены и эпидемиологии в ЯНАО в г. Новый Уренгой, Тазовском районе” заболеваемость гриппом также имеет тенденцию к увеличению несмотря на проводимые мероприятия средствами специфической профилактики. За

исследуемый период зарегистрировано 978 подтвержденных случаев гриппа. Показатель заболеваемости гриппом составил в 2019 г. 208,7 на 100 тыс. населения против 282,7 в 2022 г. Поступило 6860 проб на определение РНК гриппа. В 2022г подступило 3033 пробы, против 2019 г. — 1321 проба. Выявление РНК вирусов гриппа составило 29,2% в 2019г, против 8,5% в 2022 г. Несмотря на снижение, выявление РНК вирусов гриппа, сохраняется тенденция к увеличению заболеваемости. При анализе полученных результатов исследования, в исследуемые периоды, отмечается доминирование гриппа А(Н1N1) pd-09. Исключение составил эпидсезон 2020-2021 г. , совпавший с эпидемией новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), где определился доминирующий вирус гриппа типа А/Н3N2.

Но в 2022г, помимо выделения РНК гриппа А(Н1N1)pd-09от больных, увеличилось число пациентов с гриппом типа В и достигло 2,4% (n=75). Данные результаты исследования, полученные при обследовании материала от больных с диагнозом грипп и ОРВИ в эпидемические сезоны 2019-2022 гг., подтверждаются из Государственного доклада «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения в Российской Федерации в 2022г» Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

№ п/п	Показатель	Эпидемический сезон 2019-2020 гг.	Эпидемический сезон 2020-2021 гг.	Эпидемический сезон 2021-2022 гг.
1	Грипп А/В	n=386	n=170	n=258
2	A/H1N1 (sw2009)	10,6% (242)	0	5,6% (170)
3	A/H1N1	3,1% (71)	0	0
4	A/H3N2	3,2%(73)	10,8(168)	0,4% (13)
5	Грипп В	0	0,1% (2)	2,4% (75)
6	ОРВИ	n=608	n=608	n=996
7	hMPV	2,0% (55)	5,9% (96)	1,5% (59)
8	hRSV	6,2% (169)	6,7% (113)	4,7% (176)
9	hAD	1,8% (50)	2,7% (46)	3,4% (128)
10	hBOC	1,1% (32)	2,6% (45)	1,7% (64)
11	hRV	6,3% (172)	8,2% (137)	8,2%(308)
12	hCOV	2,5% (68)	4,1% (70)	3,6% (136)
13	hPIV1	1,1% (31)	0,3% (6)	0,7% (26)
14	hPIV2	0,1% (4)	0,1% (2)	0,4% (15)
15	hPIV3	0,8% (22)	2,0% (34)	2,0% (73)
16	hPIV4	0,1% (5)	3,4% (59)	0,2% (11)

Выводы: Учитывая настороженность к возникновению пандемии гриппа, проведение оперативного эпидемиологического надзора, а также внедрение более прогрессивных методов диагностики респираторных инфекций на уровне медицинских организаций, позволяют изучать циркуляцию вируса гриппа и ОРВИ, оценку эффективности противогриппозных вакцин и противовирусных препаратов. Полученные результаты этиологии ОРВИ и гриппа в эпидемиологических сезонах 2019–2022 г. на территории г. Новый Уренгой, характеризуются сниже-

нием циркуляции вируса типа А(Н3N2) и возрастание циркуляции вируса типа В и вируса А(Н1N1)pd-09. Внедрение диагностики гриппа и ОРВИ методом ПЦР позволило повысить в максимально короткие сроки предоставить этиологическую расшифровку респираторных заболеваний врачам-специалистам широкого профиля. Своевременная диагностика и лечение пациентов позволяет клиницистам избежать возникновения тяжелых форм и осложнения заболевания, а также проведение профилактических и противозидемических мероприятий.

НОВЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ ГРИППА В/НОРВЕГИЯ/2134/2019 ЯМАГАТСКОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ЛИНИИ

Царева Т.Р., Сорокин Е.В., Ажойчик Е.В., Флорен А.М., Грудинин М.П.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Грипп является одной из самых частых причин респираторных заболеваний, до сих пор вызывая сезонные эпидемии, наносящие значительный ущерб. Генетическое разнообразие и высокая изменчивость современных штаммов, представленных 2 линиями — Ямагатской и Викторианской, определяет перспективность изучения эволюционной динамики вируса, а также разработки панелей моноклональных антител (МКА), направленных как к уникальным для каждого отдельного штамма, так и к консервативным эпитопам.

В лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева были получены 12 гибридом, продуцентов МКА к вирусу В/Норвегия/2134/2019, который относится к Ямагатской эволюционной линии.

В ходе исследования для подтверждения специфичности полученных МКА был проведен ИФА с вирусами гриппа А и гриппа В Викторианской линии. Установлено, что все МКА были специфичны только в отношении штаммов вируса гриппа В Ямагатской линии. Показано, что все полученные МКА обладали специфической антиагглютинирующей и вируснейтрализующей активностью. Изучение направленности МКА методом иммуноблоттинга позволило установить, что все МКА взаимодействовали с сайтом в составе тяжелой цепи гемагглютинина (НA1).

Известно, что получение эскейп-мутантов (ЭМ), резистентных к действию вируснейтрализующих МКА, является ценным инструментом в изучении изменчивости антигенной структуры гемагглютинина и идентификации иммунодоминантных эпитопов в составе НA1. Использование МКА позволяет определить, является ли антигенная детерминанта вирусного белка, с которой они взаимодействуют, индуктором синтеза вируснейтрализующих антител. Т.к., все разработанные МКА обладали выраженной вируснейтрализующей активностью, это обеспечило в дальнейшем возможность получения ЭМ вируса. ЭМ были разработаны для всей панели 12 МКА методом клонирования в присутствии избытка МКА. Смеси вирус-МКА инкубировали в течение часа при 37°C, после чего вводили в куриные

эмбрионы. Через 72 часа аллантаисную жидкость собирали и исследовали в реакции гемагглютинации. Выросшие эскейп-мутанты клонировали 3 раза методом предельных разведений, после чего исследовали их способность реагировать с гомологичными и гетерологичными МКА.

Анализ ЭМ в перекрестной реакции торможения гемагглютинации с МКА показал, что исследуемые МКА можно разделить на 4 группы:

1. В первую группу вошли МКА 2A5 и 2D8. Оба МКА показывают высокий титр со штаммом-иммуногеном и не работают с ЭМ друг друга. С прочими полученными ЭМ группа показывает высокие титры (от 1/4 титра до цельного титра), с незначительными отличиями друг от друга (титры МКА отличаются не более чем в 2 раза).

2. Вторая группа достаточно гетерогенна. В нее были включены МКА 3D1, 4D6, 1C10, 4G3, 1D10, 5A11. Группа показывает сходные титры со штаммом-иммуногеном (результаты отличны не более чем в 2 раза). Не работают с ЭМ друг друга, имеются перекресты с группой 3: МКА 4D6 не работает с ЭМ к МКА 3F2, МКА 4G3 и 1D10 — с ЭМ к МКА 6E9. Титры с ЭМ к МКА первой группы отличаются от 1/128 или 1/256 титра, например, МКА 4G3 и 5A11, до цельного титра — МКА 1D10.

3. Третья группа, куда вошли МКА 1D11, 3F2, 6E9, также отличается разнородностью. МКА 1D11 слабо реагирует со всеми ЭМ, от 1/128 до 1/8 титра, кроме ЭМ к МКА 4D11, с которым оно показывает цельный титр. МКА 3F2 слабо реагирует с большинством полученных ЭМ, от 1/64 до 1/32 титра, в том числе и собственным ЭМ, но показывает цельный титр с ЭМ к МКА первой группы и с ЭМ к МКА 4D11. МКА 6E9 имеет сравнительно небольшой титр со штаммом-иммуногеном и показывает сходные результаты со всеми полученными ЭМ, отличие не более чем в 4 раза, в большинстве случаев показывает цельный титр, но не работает с ЭМ к МКА 3F2.

4. В последнюю группу входит уникальное МКА панели — 4D11, который взаимодействует со всеми ЭМ (от 1/4 до цельного титра) и слабо взаимодействует с гомологичным ЭМ (1/256 титра).

ТАБЛИЦА 1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭСКЕЙП-МУТАНТОВ ВИРУСА ГРИППА В/НОРВЕГИЯ/2134/2019 С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ В РЕАКЦИИ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Штамм (ЭМ)	Титр МКА в РТГА (представлена обратная величина)											
	2A5	2D8	3D1	4D6	1C10	4G3	1D10	5A11	1D11	3F2	6E9	4D11
В/Нор/2134/19	163840	163840	40960	20480	20480	40960	20480	40960	40960	20480	2560	40960
2A5	<80	80	20480	2560	5120	320	20480	320	640	20480	640	20480
2D8	<80	80	40960	40960	10240	320	40960	160	640	20480	640	20480
3D1	163840	81920	<80	<80	<80	<80	<80	640	640	2560	2560	10240
4D6	81920	40960	<80	<80	<80	<80	<80	<80	2560	1280	2560	20480
1C10	163840	81920	<80	<80	<80	<80	<80	160	320	2560	2560	20480
4G3	81920	40960	<80	<80	<80	<80	<80	<80	5120	1280	2560	10240
1D10	163840	81920	<80	<80	<80	<80	<80	<80	5120	2560	5120	20480
5A11	81920	81920	<80	<80	<80	<80	<80	160	320	2560	2560	10240
1D11	81920	20480	40960	1280	<80	<80	10240	10240	<80	1280	2560	20480
3F2	163840	163840	20480	<80	2560	1280	20480	1280	1280	640	<20	20480
6E9	163840	163840	640	1280	320	<80	<80	320	<80	640	<20	40960
4D11	163840	81920	81920	81920	10240	40960	10240	20480	40960	20480	2560	160
Группы МКА	1		2					3			4	

Таким образом, на основании взаимодействия моноклональных антител с полученными эскейп-мутантами в перекрестной реакции торможения гемагглютинации сделано предположение о направленности моноклональных антител панели к четырем различным эпитопам (сайтам связывания).

Как известно, гемагглютинин вируса гриппа В включает четыре основные антигенные области — петля-120, петля-150, петля-160, спираль-190 и окружающие их об-

ласти. Эти структуры расположены в непосредственной близости или частично включены в состав рецептор-связывающего сайта. Из-за своего близкого взаиморасположения, данные сайты образуют единый протяженный антигенный сайт. Это предположение совпадает с нашими результатами, где одно МКА распознает антигенные детерминанты в двух структурно отличных друг от друга, но вместе с тем близко расположенных областях молекулы гемагглютинаина.

ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К КОКЛЮШУ В РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ И ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОКЛЮША И ПАРАКОКЛЮША В 2022-2023.

Шипулина О.Ю., Абрамова М.С., Комова Д.М., Артеменко Э.С.

АО «ЛабКвест», Москва, Россия

Введение. В 2022 и 2023 годах в России отмечается рост заболеваемости коклюшем по сравнению с 2021 годом. Главная причина — отказ от вакцинации, а также — снятие ограничений (карантин, масочный режим).

Цель исследования. Оценить иммунитет к коклюшу в разных возрастных группах и в разных регионах РФ, а также определить долю заболевших коклюшем среди детей и взрослых.

Материалы и методы. Анализ данных по количественному определению антител класса IgG к *Bordetella pertussis* (Anti- *Bordetella pertussis* IgG), проводили за период с 1.01.2023 по 3.08.2023. Для определения использовались наборы реагентов SeroPertussis IgG (Savyon Diagnostics). Результаты получали в МЕ/мл. Всего проанализировано 1818 результата. Образцы крови получали из Москвы и МО (471), СКФО (1037), включая Чечню (596),

Северную Осетию (335), Дагестан (27), Карачаево-Черкесскую и Кабардино-Балкарскую Республики (79), а также ЮФО и Крым (62).

ДНК возбудителей коклюша и паракоклюша определяли в мазках из ротоглотки с помощью набора реагентов «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора), который позволяет выявлять и дифференцировать ДНК *Bordetella pertussis/parapertussis/bronchiseptica*. С 1.04.22 по 31.12.2022 было протестировано 676 образцов, с 1.01.2023 по 24.09.2023 было протестировано 1322 образца. В 2022 году наибольшее количество мазков пришло из Чечни — 476 (70,4%), Из Москвы и МО — 122 (18,0%), из Дагестана, Северной Осетии и Абхазии пришло 17 (2,5%), 8 (1,2%) и 18 (2,7%), соответственно. В 2023 году из Чечни пришло 276 (20,9%) образцов, Из Москвы и МО — 224 (16,9%), из Дагестана, Северной Осетии и Карачаево-Черкесской Республики — 14 (1,1%), 98 (7,4%) и 142 (10,7%). Наибольшее количество мазков в 2023 году пришло из Абхазии — 451 (34,1%). Также были образцы из ПФО (Башкирия, Удмуртия) — 28 (2,1%) и ЮФО (Краснодарский, Ставропольский) и Крым — 57 (4,3%). По возрасту все пациенты были разделены на группы — от 0 до 2 лет, от 2 до 7 лет, от 7 до 16 лет и старше.

Результаты и обсуждение. Из 1818 результатов исследования крови на IgG к *Bordetella pertussis*, 806 были

отрицательными или сомнительными (<0,11 МЕ), что составляет 44,3%. Доли отрицательных и сомнительных результатов в разных регионах был различный — 36,3% в Москве и МО, 33,9% — в ЮФО, 37,0% — в Северной Осетии, 48,1% — в Карачаево-Черкесской и Кабардино-Балкарской Республики. В Чечне и Дагестане доли отрицательных и сомнительных были самыми высокими и составили 55,2% и 55,6%, соответственно.

Доля серонегативных лиц различалась в разных возрастных группах. Среди детей до года она составила 84%. В группе с 1 до 2 лет — 77,9%, с 2 до 3 лет — 54,3%, с 3 до 4 лет — 51,3%, с 4 до 6 лет — 43,5%, с 6 до 10 лет — 32,6%, с 10 до 15 лет — 19,1%, у подростков с 15 до 18 лет — 15,8%, у взрослых старше 19 лет — 26,9%. Таким образом, самыми незащищенными от коклюша являются дети до года и дети дошкольного возраста.

Из 676 мазков, доставленных в лабораторию в 2022 году, в 253 (37,4%) была обнаружена ДНК *B. pertussis* и в 18 (2,66%) — ДНК *B. parapertussis*, ДНК *Bordetella bronchiseptica* не встречалась. Из 1322 мазков, доставленных в 2023 году ДНК *B. pertussis* и ДНК *B. parapertussis* были обнаружены в 503 (38,1%) и 4 (0,3%) образцов, соответственно. Частота выявления ДНК *B. pertussis* и ДНК *B. parapertussis* в разных регионах в 2022 и 2023 годах представлена в Таблице:

Регион	Кол-во мазков	ДНК <i>B. pertussis</i>	ДНК <i>B. parapertussis</i>
2022 год (апрель-декабрь)			
Москва и МО	122	7,4%	7,4%
Чечня	476	49,2%	1,5%
Дагестан	17	35,3%	0
Северная Осетия	8	12,5%	0
Абхазия	18	0	0
ПФО (Башкирия)	9	0	22,2%
2023 год (январь-сентябрь)			
Москва и МО	224	18,3%	0
Чечня	276	53,6%	0,36%
Дагестан	14	50%	0
Северная Осетия	98	33,7%	1,0%
Абхазия	451	42,8%	0,2%
КЧР	142	37,3%	0,7%
ПФО (Башкирия, Удмуртия)	28	14,3%	0
ЮФО	57	21,1%	0

Из представленных данных видно, что в наибольшая частота выявления ДНК *B. pertussis* наблюдается в республиках Северного Кавказа, а в Центральном, Приволжском и Южном ФО — значительно меньше. Следует отметить, что в 2023 году частота выявления ДНК *B. pertussis* выросла

в Москве и МО, Северной Осетии, Абхазии, по сравнению с 2022 годом.

Частота выявления ДНК *B. pertussis* и ДНК *B. parapertussis* в разных возрастных группах в 2022 и 2023 годах представлена в Таблице 2:

Группы по возрасту	Кол-во мазков	ДНК <i>B. pertussis</i>	ДНК <i>B. paraptussis</i>
2022 год (апрель-декабрь)			
0-2 года	332	50,9%	1,5%
2-7 лет	256	28,9%	4,7%
7-16 лет	56	16,1%	1,8%
старше 16 лет	26	3,9%	0
2023 год (январь-сентябрь)			
0-2 года	357	51%	0,6%
2-7 лет	531	40%	0
7-16 лет	282	33%	0
старше 16 лет	152	15,1%	1,3%

Из данных, представленных в таблице, следует, что наиболее часто ДНК *B. pertussis* выявлялась у детей от 0 до 7 лет, что ожидаемо, поскольку в этих возрастных группах наибольшая доля неиммунных лиц. В 2023 году частота выявления ДНК *B. pertussis* выросла во всех возрастных группах.

Заключение. Результаты исследования демонстрируют более высокий процент выявления ДНК *B. pertussis*

в тех регионах и возрастных группах, в которых наиболее высокая доля неиммунных лиц. Отказ родителей от вакцинации детей до года вакциной АКДС (в 3, 4,5 и 6 месяцев по календарю прививок) приводит к тому, что заболевают маленькие дети, которые тяжело переносят коклюш, с частыми отдаленными последствиями или летальным исходом.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА КОРИ

Шипулина О.Ю., Абрамова М.С., Комова Д.М., Кузнецова И.В.

АО «ЛабКвест», Москва, Россия

Введение. Корь является одной из самых контагиозных инфекций, при этом относится к управляемым инфекциям, и рост заболеваемости в 2023 году, по данным Роспотребнадзора, очевидно связан с отказом от вакцинации.

Цель исследования. Определить долю иммунной прослойки в разных возрастных группах и в разных регионах РФ, а также оценить заболеваемость корью по выявлению РНК вируса кори.

Материалы и методы. Анализ данных по количественному определению антител класса IgG к вирусу кори (Anti-Measles IgG), проводили за период с 1.01.2023 по 31.07.2023. Для определения использовались наборы реагентов ИФА-Корь-IgG (ЗАО «Эколаб»). Всего проанализировано 8452 результата. Образцы крови получали из Москвы и МО (5897), ЦФО без МО (306), СКФО (1331), ЮФО (563), СЗФО (124), ПФО (104), СФО (71). РНК вируса кори определяли в мазках из носо/ротоглотки с помощью набора реагентов «АмплиТест Корь» (ЦСП, ФМБА). Всего с мая по середину сентября исследовано 106 образцов мазков. Образцы присылали на 1-5 день после появления сыпи, также 1 образец был прислан по контакту без клинических симптомов кори.

Результаты и обсуждение. Из 8452 результатов по исследованию крови на IgG к вирусу кори, 6177 были положительными (>0,18 МЕ) — 73,1%, при этом доля положительных по разным регионам значительно не отличалась — 72,9% в Москве и МО, 69,3% в ЦФО, 74,4% — в Республиках СКФО, 76,6% — в ЮФО, 69,4 и 69,2 — с СЗФО и ПФО, соответственно.

Доля серонегативных результатов различалась в разных возрастных группах. Среди детей до года она составила 58,3%. В группе с 1 до 2 лет — 88,9%, с 2 до 3 лет — 72,0%, с 3 до 4 лет — 72,2%. Этот показатель снижался в старших возрастных группах — с 4 до 6 лет — 67,3%, с 6 до 9 лет — 31,8%, с 10 до 14 лет — 30,7%. В группах подростков (15-18 лет), молодых людей (19-25 лет) и возрастной группе с 26 до 40 лет доля серонегативных результатов составила 37,8, 34,2 и 35,5%, соответственно. Среди людей старше 41 года доля серонегативных лиц — 15,8%. Таким образом, самыми незащищенными от кори являются дети дошкольного возраста.

Из 103 первичных образцов мазков из носо/ротоглотки, присланных в лабораторию, 15 были положительными, таким образом, первично положительными были 15 из 103 (14,6%). При этом в образцах из Москвы и МО

положительными были 13,4% (11 из 82), а из республик СКФО — 29,4% (5 из 17).

Из 15 первично положительных образцов 9 были от детей и подростков от 1 до 15 лет, средний цикл, отражающий вирусную нагрузку (Ct) составил 22,1 (от 20,0 до 25,7). Остальные 7 первично-положительных образцов были от взрослых от 28 до 50 лет, средний Ct составил 29,1 (21,9 — 37,7). Таким образом, средняя вирусная нагрузка у детей и подростков выше, чем у взрослых. В группе от 1 до 15 лет всего было протестировано 49 человек, среди которых 18,4% (9 человек) были положительными, а в группе старше 15 лет протестировано 57 человек, положительными были 12,3% (7 человек).

Две пациентки в возрасте 51 и 42 года наблюдались

в динамике. У первой пациентки сигнал (Ct) был 27,2, через 7 дней стал 31,4. У второй — был 36,3, через 7 дней стал 38,0.

Заключение. Результаты исследования показывают, что значительная доля серонегативных лиц наблюдается среди детей дошкольного возраста, что согласуется с данными метаанализа (Ноздрачева. А.В., Семенов Т.А., 2020). Именно эта группа подвержена более высокому риску инфицирования. Относительно более высокие концентрации РНК вируса кори у маленьких детей отражают более высокую активность вируса, что может быть связано с полным отсутствием иммунитета к моменту первой встречи с вирусом. У взрослых вирус менее активен, возможно, по причине наличия клеточного иммунитета.

Раздел 5. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИЗУЧЕНИИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ Е К МОЛЕКУЛЯРНЫМ АНТИГЕНАМ ГЕЛЬМИНТОВ ПРИ РАСПРОСТРАНЕННЫХ НЕМАТОДОЗАХ

Агафонова Е.В.^{1,3}, Решетникова И.Д.^{1,2}, Троценко О.А.¹, Смирнова Л.Р.¹, Сафина Л.Ф.¹, Камалова Э.Р.¹

¹ ФБУН Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора

² ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный университет

³ ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет МЗ РФ

Нематодозы — паразитарные заболевания, вызванные круглыми червями (нематодами), передающиеся фекально-оральным путем. Известными представителями данной группы гельминтов являются *Ascaris (Asc) lumbricoidea*, *Enterobius vermicularis*, *Trichocephalus trichiurus*. Внедрение в лабораторную практику современных иммунологических методов оптимизировало диагностику других нематодозов, в частности токсокароза и анизакидоза. Иммунопатологическое действие на организм хозяина связанное с выраженной иммуносупрессией и аллергизацией организма определяется широким молекулярным спектром антигенов гельминтов. Официально признанные ВОЗ молекулярные антигены *As. lumbricoidea*, способные индуцировать специфические и неспецифические иммунные реакции-Asc s 1 (ABA-1) и аскаридин (Asc I3– тропомиозин). Идентифицировано более 20 антигенных молекул Anisacis (Ani) simplex. К основным (входят в состав экстракта Р 4) относят-Ani s 1 и Ani s7– “золотой стандарт” диагностики анизакидоза, Белки мышечной ткани Ani s 2 (парамиозин) и Ani s 3 (тропомиозин) также являющиеся основными антигенными молекулами *Ani. simplex*, характеризуются широкой перекрестной реактивностью с другими тропомиозинами нематод и беспозвоночных. Важную роль в реализации гиперчувствительности отводят TcES Ag (экскреторно-секреторным антигенам *Tox. canis*).

Цель исследования — изучение специфических иммуноглобулинов Е (IgE) к молекулярным антигенам нематод -*Asc. lumbricoidea*, *Ani. simplex*, *Toxocara (Tox) canis*.

Методы исследования. На первом этапе исследования проводились у пациентов, направленных в специализированную консультативно-диагностическую поликлинику с подозрением на паразитарную инвазию (n=2105). Для диагностики паразитозов использовались прямые копроовоскопические и иммунологические методы диагностики– утвержденные МУК Роспотребнадзора (Parasер, влажный мазок из консерванта) и разработанные на базе ФБУН КНИИЭМ — “Комплексная система паразитологической диагностики» (Патент N 2368324), “Способ диагностики аскаридоза” (Патент N 2371719). Методы иммунологической диагностики включали определение специфических IgG антител (IgG AT) к антигенам гельминтов (тест-системы “Гельминты-IgG-ИФА-БЕСТ”,

“Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ”, “Аскарида-IgG-ИФА-БЕСТ”, “Анизакида-IgG-ИФА БЕСТ”, “Трихинелла-IgG-ИФА-БЕСТ”, “Клонорхис-IgG-ИФА-БЕСТ”, “Цистицерк-IgG-ИФА-БЕСТ”; Новосибирск, Россия). Использовался расчетный показатель– коэффициент позитивности (КП), отражающий концентрацию антител, согласно инструкции производителя. При токсокарозе применяли оценку в титрах антител. Пациенты консультировались, и в дальнейшем, наблюдались врачом паразитологом. На втором этапе, в результате комплексного обследования (клинические, инструментальные, лабораторные методы диагностики) были сформированы 3 группы: 1– инфицирование *Asc. lumbricoidea* (n=22), 2 я –инфицирование *Ani. simplex* (n=20), 3– инфицирование *Tox. canis* (n=15). В выделенных группах проводили определение sIgE к антигенам *Asc. lumbricoidea*, (P1), *Ani. simplex*,(P 4), *Tox. canis* (P 3) (“Алкор-Био”, Россия, Санкт-Петербург).

Результаты. Серопревалентность по классу Ig G к антигенам аскариды составила 17,7 % из 2105 обследованных на первом этапе. Очень высокий уровень AT (КП ≥6) регистрировался в 8,3%, высокий (КП ≥3-5,9) в 19,4 %, средний (КП ≥2-2,9) в 22,0 % низкий (КП≥1-1,9) в 50,3 %. Группа 1 формировалась при комплексном обследовании (клиническая картина; прямые копроовоскопические методы; уровень sIgG AT). Наряду с клинической картиной и данными прямого копроовоскопического обследования учитывали очень высокий и высокий уровни sIgG AT. У пациентов с клинической картиной аскаридоза прямыми копроовоскопическими методами яйца гельминта обнаружены в 50 % (n 11), в 13,6 % (n 3) положительный результат прямой копроовоскопической диагностики сочетался с высоким уровнем sIgG AT, в 40,9 % (n 9) наряду с клинической картиной патологии очень высокий (44,4 %) и высокий (55,6 %) уровни sIgG AT. Серопревалентность к *Tox. canis* составила 10,6 % из 2105 обследованных. В целом, очень высокий титр sIgG AT (≥1/3200) составил 7,2 %, высокий (1/800-1/3200) — 19,3 %, средний (1/400-1/800)— 26,9 %, низкий (1/200-1/400) — 46,6 %. Серопревалентность к *Ani. simplex* составила 7,3 %, превалировал низкий уровень антител (75,3 %), средний составил 10,4 %, высокий 10,4 %, очень высокий— 3,9 %. Группы 2 и 3 формировались при использовании комплексного подхода (клини-

ческая картина; инструментальная диагностика; .slgG AT). Для диагностики токсокароза учитывали высокий (1/800-1/3200) и очень высокий ($\geq 1/3200$) титры антител. Для диагностики анизакидоза учитывали очень высокий (КП ≥ 6) и высокий (КП $\geq 3-5,9$) уровни АТ.

Показано, что у инфицированных *Asc. lumbricoideus* вырабатываются как неспецифические, так и slgE-антитела к молекулам аскариды. По данным литературы, уровень slgE АТ не зависит от количества гельминтов в кишечнике и может отмечаться даже при отсутствии активной инфекции. В состав Р1 входят антигены АВА-1 и Asc 13. Уровень slgE ранжировался согласно рекомендациям фирмы производителя: 0,35-0,69 МЕ/мл — минимальный (I класс); 0,7-3,49 МЕ/мл — средний (II- класс); 3,5-17,49 МЕ/мл умеренно высокий (III класс); 3,5 — 17,49 МЕ/мл — высокий (IV класс); 17,5-52,49 МЕ/мл — очень высокий (V класс); 52,5-99,99 МЕ/мл; VI- >100 МЕ/мл крайне высокий. В группе 1 (таб.1) slgE к молекулярным антигенам *Asc Lumbricoideus* регистрировались в 91,6 %, при этом преобладали уровни III (33,3 %), II (28,6 %), IV(19,0 %) классов. Уровень I класса составил 14,3

%, V- 4,8 %. У лиц с высоким уровнем аскарид-slgE АТ отмечались повышенные уровни slgE к клещам домашней пыли. SlgE к антигенам *Asc. Lumbricoideus* регистрировались также в группе 2 (15 %), при этом преобладал низкий (66,6 %) уровень slgE. В группе 3 slg E к антигенам *Asc. lumbricoideus* регистрировались в 26,7 %, при этом преобладали низкий (50,0 %) и средний (50,0 %) уровни АТ. Данные феномены, по видимому, определяются перекрестными реакциями slgE АТ, которые, по данным литературы, связаны с гиперчувствительностью к тропомиозинам. В группе 2 slgE к антигенам *Ani. simpiex* регистрировались в 25,0 %. Уровень I класса составил 40,0 %, II- 40,0 %, III- 20,0 %. Таким образом, при анизакидозе регистрируется преимущественно низкий и средний уровни slg E к антигенам гельминта. В группе 1 slg E к антигенам *Ani. simpiex* отмечались в 4,5 % (уровень I класса), в группе 3 в 5,6 % (уровень I класса). В группе 3 slg E к антигенам *Tox. canis* регистрировались в 80,0 %. Преобладали уровни II (50,0 %) и III (33,3 %) классов. В группе 1 отмечались slg E к антигенам *Tox. canis* в 4,5 % (уровень I класса), в группе 2 в 5,0 % (уровень I класса)

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАГЕНОМНЫХ СООБЩЕСТВ И ГЕНОМА КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМОГО ШТАММА *HELICOBACTER PYLORI* В РАЗВИТИИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Воропаев Е.В.¹, Зятыков А.А.¹, Шафорост А.С.¹, Осипкина О.В.¹, Баранов О.Ю.², Воропаева А.В.³

¹ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

² Национальная Академия наук Республики Беларусь, Минск, Беларусь

³ Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь

Актуальность: На сегодняшний день актуальной проблемой современной диагностики заболеваний в основе которых лежит инфекционный канцерогенез, остается оценка степени генетического вклада патогена-возбудителя и человека-хозяина в развитии патологических состояний. К таким канцерогенным инфекционным агентам безусловно относится патогенная грамотрицательная бактерия *Helicobacter pylori* (HP).

Цель: определить доминирующие метагеномные сообщества у пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) инфицированных HP, изучить уровень инфицированности HP популяции пациентов с заболеваниями ЖКТ и исследовать особенности генетической структуры клинически значимого штамма HP.

Материалы. Биологический банк образцов включает 438 биоптатов слизистой оболочки желудка больных с различной патологией ЖКТ и 110 образцов сыворотки крови пациентов, проживающих в Гомельской области. Геном клинически значимого штамма HP (GenBank NCBI: NZ_CP034314), выделенного в Беларуси.

Методы. При изучении HP-инфекции использовались методы иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для изучения метагенома желудка использовали анализ регионов V3/V4 гена

16S бактерий на платформе Illumina MiSeq. Для изучения особенностей генетической структуры *Helicobacter pylori* использовали метод секвенирования ДНК следующего поколения (NGS) на платформе ION TORRENT.

Результаты. ДНК HP была обнаружена у 60% (263 из 438 биоптатов желудка) пациентов с различными заболеваниями желудка (гастрит, язва желудка и рак желудка). Суммарные антитела к антигену CagA HP ответственному за патогенный потенциал бактерии, обнаружены у 71 из 110 обследованных (65%). Особенности метагенома желудка у пациентов с заболеваниями желудка были следующие: у пациентов, не инфицированных HP, выявлены фракции, соответствующие микроорганизмам — *Enterococcus*, *Capnocytophaga*, *Odoribacter*, *Pseudomonas*, *Eubacterium*, *Catonella*, *Megasphaera*, *Veilonella*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Mycoplasma*, *Streptococcus* *Leptotrichia*, *Bacteroides*.

Выводы: При HP-инфекции отмечено снижение биоразнообразия микробиома желудка — *Helicobacter* (10,7%), *Streptococcus* (6,3%), *Lactobacillus* (6,0%), *Bacteroides* (5,8%), *Catonella* 5,8 (%). Структура генома клинически значимого штамма HP42K (GenBank NCBI: NZ_CP034314), выделенного в Беларуси, показала наличие IS-элемента в хромосомной ДНК и в плазмиде рHP42-1, что может быть ответственно за

его значительные генетические модификации. Наличие в структуре гена *CagA* мотива EPIYA-ABC и пяти мотивов ДНК AATAAGATA, а также обнаружение гена *OipA* и идентифи-

цированных аллелей *s1* и *m1a* гена *vacA* вируса *HP* позволяет предположить наличие у этого изолята определенного патогенного, но не канцерогенного потенциала.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ ЧАСТЬЮ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ДНК ПРОСТЕЙШИХ ПАРАЗИТОВ В ФЕКАЛИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Девятов А.А., Давыдова Е.Е., Лупарев А.Р., Полякова В.А., Толоконцева А.А., Шуряева А.К., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА, Москва, Россия

Введение. Паразитарные заболевания в мире занимают значимую долю в структуре инфекционных заболеваний. В России по данным Роспотребнадзора ежегодно регистрируется около 250 тыс. случаев паразитарных заболеваний в год. При этом, согласно ряду оценок, это количество сильно занижено, и реальное количество людей, заражённых паразитами, может достигать 20 млн. На сегодняшний день золотым стандартом диагностики паразитозов являются методы микроскопии. Однако данные методы требуют высокой квалификации специалистов, что затрудняет их широкое применение. Наиболее остро проблема качественной диагностики стоит для протозойных инфекций, так как простейших труднее обнаруживать в биологическом материале по сравнению с яйцами гельминтов ввиду их меньшего размера и многообразия жизненных форм. Кроме того, отдельные виды простейших, например, *Cryptosporidium spp.* практически невозможно обнаружить без специального окрашивания. Так, согласно статистике Роспотребнадзора, в общей структуре выявленных паразитозов доля гельминтозов в 2022 г. составила 88,3 %, протозоозов — 11,7 %. Кроме того, некоторые простейшие, такие как *Blastocystis spp* или *Dientamoeba fragilis*, не учитываются в государственной статистике ввиду их неопределённого патогенного потенциала. В связи с этим, актуальной является разработка и внедрение более универсальных, стандартизуемых и чувствительных методов молекулярной диагностики протозоозов, таких как ПЦР. Одной из главных проблем на пути внедрения молекулярно-диагностических методов диагностики протозоозов в клиническую практику является отсутствие стандартизованного эффективного метода выделения паразитарной ДНК из клинических образцов. В первую очередь это относится к диагностике внутрикишечных протозоозов, так как фекалии представляет собой многокомпонентную матрицу, содержащую самые разные соединения, в том числе желчные кислоты и другие вещества, которые ингибируют реакцию амплификации.

Цель работы. Разработка тест-системы с выделительной частью для обнаружения в фекалиях человека ДНК простейших паразитов *Cryptosporidium spp*, *Giardia intestinalis*, *Blastocystis spp*, *Dientamoeba fragilis*, *Cystoisospora belli*, *Cyclospora cayetanensis* на основе метода ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Материалы и методы. Для разработки метода выделительного комплекта реагентов использовали модельные

образцы фекалий ($n=10$) от телят, питающихся молоком, предварительно охарактеризованные, как содержащие цисты криптоспоридий. Исходные образцы суспендировали в 70% этиловом спирте в соотношении примерно 1:1. Далее образцы хранили на $+4^{\circ}\text{C}$ для последующего выделения. Для предварительного концентрирования образцов использовали концентраторы фирмы ООО «ГЕМ» (Россия), в которых раствор производителя был заменён на раствор нашей собственной разработки. Для разработки ПЦР-комплекта реагентов использовали образцы ранее выделенной ДНК фекалий ($n=73$) различных людей, предоставленные сотрудником ФГБУ «ЦСП» ФМБА России А.С. Курносковым. Для выбора олигонуклеотидных праймеров и зондов использовали последовательности генов-мишеней из базы данных NCBI, множественное выравнивание проводили в программе UGENE. Оценивали наличие неспецифических вторичных структур с использованием программы PrimerSelect, проверку специфичности проводили с помощью BLAST. Аналитическую чувствительность ПЦР оценивали на плазмидных препаратах с известной концентрацией, содержащих целевые фрагменты ДНК. Концентрацию ДНК определяли с помощью цифровой капельной ПЦР X200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, США). ПЦР реакционные смеси содержали целевые праймеры в концентрации 0,32 мкМ, зонды в концентрации 0,16 мкМ каждого, 0,2 мМ dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы в однократном FRT буфере (АО Гентерра, Россия). Объем реакционной смеси 25 мкл, из них объем исследуемого образца — 10 мкл. Условия амплификации — предварительный прогрев при 95°C (15 мин), далее 45 циклов: 95°C — 15 с, 58°C — 30 с, 72°C — 15 с.

Результаты и обсуждения. Комплект для ПЦР-детекции был разработан в мультиплексном формате для одновременной детекции ДНК шести целевых протозойных паразитов в двух ПЦР-смесях. Были выбраны олигонуклеотидные праймеры и зонды, и в предложенных сочетаниях была подтверждена специфичность и отсутствие кросс-реакция с близкородственными видами и клиническим материалом, не содержащим целевых видов. Для каждого показателя установлена аналитическая чувствительность не менее 1×10^3 ГЭ/мл.

В процессе разработки выделительной части набора было показано, что исходный раствор, используемый в концентраторах ООО «ГЕМ» не является оптимальным для целей диагностики с использованием ПЦР, так как основан на 10% растворе формалина. Вследствие этого, был разра-

ботан собственный концентрирующий раствор, основанный на фосфатном буфере. Для механического дробления образцов были выбраны бусины из диоксида циркония, легированные оксидом иттрия, так как они не разрушают друг друга в процессе дробления и не сорбируют на себя ДНК. При выборе колонок для сорбции ДНК было показано, что ввиду большого количества нуклеиновых кислот в исследуемом материале для эффективной экстракции паразитарной ДНК недостаточно 4 слоёв силики (например, колонки AAS204Si2 biopharmexpert), и предпочтительными являются колонки с 8 слоями силики (например, 8-слойная колонка GenFollower). Выделительный комплект реагентов был успешно протестирован на образцах нативного кала, а также на образцах фекалий, суспендированных в фосфатном буфере, физиологическом растворе (0,9% NaCl), и в 70% этиловом спирте.

Все образцы фекалий от молочных телят предварительно охарактеризованные, как содержащие криптоспоридий ($n=10$) показали положительный результат на наличие ДНК *Cryptosporidium spp.* При анализе образцов ранее выделенной ДНК из лабораторной коллекции ($n=73$) наиболее распространённым выявляемым простейшим оказался *Blastocystis spp.*, ДНК которого была выявлена в 32

пробах (44%). Данный показатель соответствует верхним оценкам распространённости данного микроорганизма в средних широтах. Вторым по распространённости среди исследуемых простейших была *Dientamoeba fragilis*. Было обнаружено 9 положительных образцов (12%). Из них в 5 образцах наблюдалась коинфекция *Blastocystis spp.* Кроме того, был найден один образец, содержащий ДНК *Cryptosporidium spp.* Наличие целевых ДНК в образцах было подтверждено секвенированием.

Заключение. Нами был разработан набор реагентов с выделительной частью для обнаружения паразитарной ДНК в фекалиях, который может работать как с нативными фекалиями, так и с ресуспендированными в спирте, физрастворе и фосфатно-солевом буфере. Выделение включает в себя 4 стадии: (1) концентрирование цист и яиц паразитов, (2) механическое дробление образца с помощью керамических бусин в лизирующем буфере, (3) осаждение ингибиторов ПЦР, (4) преципитация ДНК из гомогената на колонках из силики с последующей элюцией. Широкая распространённость *Blastocystis spp.* в клинических образцах, показанная в настоящем исследовании, свидетельствует о необходимости дальнейшего исследования данного микроорганизма и его роли в генезе кишечных заболеваний.

ДЕТЕКЦИЯ ДИАРЕЕГЕННЫХ *E. COLI* У ОБЕЗЬЯН ВИДА МАКАК СУХУМСКОГО ПИТОМНИКА

Ардашелия С.Н.¹, Джинджолия В.Г.¹, Смыр С.Р.¹, Агрба С.Л.¹, Киласония Э.Ф.¹, Аргун Э. Н.¹, Аршба И.М.², Полякова В.И.², Агумава А.А.²

¹ Государственное научное учреждение Институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, Сухум, Абхазия.

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», Сочи, Россия

Введение: Инфекционная патология обезьян, живущих в условиях неволи, представлена разнообразными инфекционными заболеваниями, вызванными, в том числе и бактериями семейства *Enterobacteriaceae*. При этом, основной причиной заболеваемости обезьян являются острые кишечные инфекции (ОКИ). Энтеробактерии как возбудители кишечных инфекций могут содержать различные факторы патогенности. Обширная литература по спонтанной патологии обезьян свидетельствует, что ОКИ обусловлены в основном патогенными представителями семейства энтеробактерий, среди которых особое место занимали шигеллы и сальмонеллы. Анализ данных бактериологического, клинического и морфологического исследования прежних лет Сухумского питомника показал, что в этиологической структуре ОКИ ведущее место принадлежало шигеллам разных серологических вариантов. Однако в дальнейшем ситуация в отношении этиологической структуры ОКИ изменилась. В последнее время не удается определить этиологическую связь в структуре кишечных инфекций с патогенными представителями семейства энтеробактерий и около 50% заболеваний остаются этиологически не расшифрованными. Появились сведения о снижении роли шигелл в патологии ЖКТ обезьян, и

увеличилось выделяемость условно-патогенных микроорганизмов, среди которых особый интерес вызывает *E.coli* некоторые штаммы, которого являются патогенными. Дифференцировать различные группы диареегенные *E.coli* (DEC) при проведении микробиологических исследований стало трудно. Наиболее распространённым методом исследования является серотипирование эшерихий в реакции агглютинации, с помощью которого не всегда удается доказать наличие патогенности.

Цель и задачи: Цель исследования оценить частоту встречаемости DEC у обезьян с дисбиотическими явлениями кишечника и клинически здоровых особей по результатам молекулярно-генетического исследования.

Материалы и методы: Объектом исследования служили 100 обезьян вида макак (*Macaca mulatta* и *fascicularis*). У 28 из них отмечали выраженные дисбиотические явления, 73 клинически здоровые обезьяны. Материалом для исследования служили фекалии. Методом ПЦР с наборами специфических праймеров выявляли DEC.

Для постановки реакции амплификации методом ПЦР с гибридизационной-флуоресцентной детекцией использовали набор реагентов «АмплиСенсЭшерихиозы-Fl» (ФГУН «ЦНИИЭ Роспотребнадзора») по инструкции произ-

водителя. Результаты интерпретировались согласно инструкции производителя тест-системы.

Результаты: Проведенное молекулярно-генетическое исследование больных и клинически здоровых обезьян выявило наличие DEC, представленные энтероинвазивными (EIEC), энтеропатогенными (EPEC) и энтероагрегативными (EAgeC) эшерихиями. Энтерогеморрагические (EHEC) и энтеротоксигенные (ETEC) эшерихии в исследуемых образцах кала обнаружены не были. У больных обезьян чаще обнаруживались EIEC у 11 (39,2%), EAgeC у 4 (14,2%), EPEC у 3 (10,7%). У одной больной обезьяны отмечено сочетание трех DEC (EIEC, EPEC и EAgeC), в двух случаях кишечные палочки были обнаружены с EIEC, EPEC и EIEC, EAgeC. Указанные особи в последствии погибли с диагнозом обусловленным воспалением ЖКТ разной степени тяжести.

DEC обнаруживалось и у клинически здоровых особей с умеренной концентрацией копий ДНК: у 10 обезьян

выявлены — EIEC, у 8ми — EPEC, у 6 — EAgeC. Выявленные у здоровых обезьян DEC, по всей видимости способны к персистенции в кишечнике животных без развития патологического процесса, но могут быть потенциальными возбудителями ОКИ.

Заключение: Таким образом, генетическое тестирование показало наличие DEC в группах как больных, так и здоровых обезьян. Данные результаты подтверждают необходимость ПЦР –диагностики для изучения патогенного потенциала и внутривидового разнообразия DEC в популяции обезьян. Детекция факторов патогенности эшерихий методом ПЦР должна быть внедрена для оценки этиологической значимости последних в структуре ОКИ. Высокий процент этиологически не расшифрованных ОКИ среди обезьян требует расширения спектра исследуемых бактериальных агентов, с привлечением новых методов диагностики. Выявляемость исследуемых патогенов у обезьян требует дальнейшего изучения.

ФИЛОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ИЗУЧЕНИИ ЦИРКУЛЯЦИИ НОРОВИРУСОВ

Епифанова Н.В., Опарина С.В., Новикова Н.А.

ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (ННИИЭМ), Нижний Новгород, Россия

Ведение. В настоящее время филодинамический анализ на основе байесовских методов статистической филогенетики широко применяется в вирусологии [1]. Норовирусы, как один из важнейших этиологических агентов острой кишечной инфекции человека (ОКИ), интенсивно изучаются в последние два десятилетия, в том числе с использованием данной методологии.

Целью работы явилось изучение циркуляции норовируса генотипа GII.17 на основе анализа нуклеотидных последовательностей (НП) генома норовирусов, циркулирующих на территории Нижегородской области, а также извлеченных из базы данных GenBank.

Материалы и методы. Выявление норовирусов у детей, госпитализированных с ОКИ в один из детских инфекционных стационаров г. Нижнего Новгорода, проводили с использованием набора реагентов «АмплиСенс ОКИ вироскрин-FL» (ЦНИИЭ, Москва). Генотипирование норовирусов осуществляли как описано ранее [2]. Выравнивание последовательностей проводили в программе MEGA11. Филодинамический анализ осуществляли путем построения байесовских филогенетических деревьев на основе алгоритма MCMC (длина цепи Маркова — 50 млн. шагов) и модели замен SRD06, реализованных в программах BEAUti 1.10.4 и BEAST 1.10.4, и визуализируемых в программе FigTree v1.4.4. Скорость эволюции рассчитывали на базе нестрогих логнормальных молекулярных часов.

Основные результаты. За период июль 2022 г. — май 2023 г. при исследовании 1224 образцов копроматериала детей с ОКИ норовирусы выявлены в 9,9% случаев, в том числе в виде моноинфекции — в 9,0%, в микст-инфекции с другими кишечными вирусами — в 0,9%. Генотип опреде-

лен для 76 изолятов, идентифицированные генотипы распределены в следующих соотношениях: GII.4Sydney[P16] — 47,4%, GII.17[P17] — 34,2%, GII.3[P12] — 10,5%, GII.6[P7] — 2,6%, GII.2[P16], GII.4Sydney[P4], GII.10[P16] и GI.4[P4] — по 1,3% каждый. При анализе спектра генотипов мы обратили внимание на увеличение в текущем сезоне доли норовируса с генотипом GII.17. В Нижнем Новгороде он был впервые обнаружен в июне 2015 года и в сезон 2015-2016 гг. занял второе место после генотипа GII.4, составив 28,1% от числа типированных изолятов. В дальнейшем его доля колебалась от 2,4 до 10,6% в разные эпидсезоны.

На основе созданной нами базы данных NoroGen, версия 2.0 (рег. №2021622566 от 19.11.2021) сформирована выборка последовательностей норовируса генотипа GII.17, которая дополнена вновь секвенированными нами НП нижегородских изолятов, а также НП из базы данных GenBank, загруженными после 02.06.2021 г. Всего в анализ вошли 303 НП норовирусов, выявленных с 1976 г. по 2023 г. в двадцати странах мира. Для анализа использован участок вирусного генома размером 525 н.о., включающий зону соединения открытых рамок считывания, кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу и капсидный белок VP1.

На филогенетическом древе последовательности кластеризовались в соответствии с идентифицированными ранее вариантами генотипа GII.17 — А, В, С и D [3]. К вариантам А и В относились 15 НП норовирусов, циркулировавших в 1976-2011 гг. в разных странах мира (Япония, Китай, Камерун, США, Россия, Франция, Французская Гвинея) и несущих ген полимеразы P3, P4, P13, P16, а также 18 НП норовирусов с полимеразой P7, P16, P17 и P33, обнаруженных в 2018-2020 гг. в сточных водах в Претории (Южная Африка).

Известно, что вариант С, возникший в 2012 году и приобретший новый ген полимеразы, который был обозначен P17, стал доминирующим в 2014–2015 гг. в странах Восточной Азии и встречался в небольшом числе случаев в других странах [3]. В 2015—2016 гг. он был вытеснен широко распространенным по всему миру вариантом D с той же полимеразой P17. К варианту D относится большинство последовательностей (187) в сконструированном нами филогенетическом дереве, в том числе НП двадцати нижегородских изолятов норовирусов, циркулировавших в 2017–2022 гг.

Вариант С (83 НП в филогенетическом дереве) не обнаруживался в мире в интервале с 2017 г. по 2020 г. Однако, оказалось, что 29 нижегородских изолятов (2021–2023 гг.), 1 изолят из США (2022 г.), 3 — из Румынии (2021 г.) и 12 — из Бразилии (2023 г.) проявили принадлежность к варианту С и сформировали отдельную ветвь в данном кластере. Очевидно, произошло возвращение варианта С генотипа GII.17 в активную циркуляцию после 4–5-летнего перерыва, в виде нового субварианта, который мы обозначили GII.17/С-2021. Он уже обнаружен в разных континентах, и вероятно, в ближайшее время в базу данных GenBank будут депонированы новые НП норовирусов данного субварианта. Окажет ли он заметное влияние на заболеваемость норовирусной инфекцией, покажут дальнейшие наблюдения.

На основе анализируемого участка генома время циркуляции общего предка для представителей генотипа GII.17 датируется 1947 г. (95% HPD: 1903–1973 гг.), расхождение предшественников вариантов С и D произошло в 2004 г. (95% HPD: 1997–2009 гг.), появление общего предка для изолятов нового субварианта варианта С — в 2018 г. (95% HPD: 2016–2020 гг.). Скорость эволюции составила $3,099E-3$ (95% HPD: $2,378E-3$ — $3,744E-3$) нуклеотидных замен/сайт/год.

Ранее нами был проведен филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей генома рекомбинанта GII.3[P12], а также гена РНК-зависимой РНК-полимеразы со специфичностью GII.P16, продемонстриро-

вавший особенности циркуляции норовирусов с данными генетическими характеристиками [4, 5].

Закключение. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей вирусного генома является удобным инструментом в изучении циркуляции норовирусов, их географической распространенности и эволюции с течением времени. Существенным ограничением данных исследований является факт депонирования последовательностей в доступные базы данных в сроки, отдаленные от момента выявления тех или вирусных штаммов, а также отсутствие во многих странах работ по секвенированию норовирусов. Однако, имеющиеся в настоящее время данные позволили показать появление и распространение в мире, начиная с 2021 года, нового субварианта варианта С норовируса генотипа GII.17[P17], что обусловило увеличение доли данного генотипа в структуре норовирусных популяций.

Литература

1. Вакуленко Ю.А., Лукашев А.Н., Десяткин А.А. Использование методов статистической филогенетики в вирусологии // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 42–56.
2. Епифанова Н.В., Новикова Н.А., Подколзин А.Т., Кулешов К.В. Методические рекомендации МР 4.4/3.1.1.0230-2021 «Генотипирование в эпидемиологическом надзоре за норовирусной инфекцией (Утверждены 21.01.2021).
3. Sang S., Yang X. Evolutionary dynamics of GII.17 norovirus // PeerJ. 2018. 6:e4333
4. Epifanova N.V., Sashina T.A., Morozova O.V., Oparina S.V., Novikova N.A. An increase in prevalence of recombinant GII.3[P12] norovirus in sporadic acute diarrhea in children in Nizhny Novgorod, Russia, 2018–2021 // Virus Genes. 2022. 58, 467–472.
5. Oparina S.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Phylogenetic analysis of noroviruses based on RNA-dependent RNA polymerase GII.P16 gene sequences // Opera Medica et Physiologica. 2022. Т. 9. № 3. С. 87–97.

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ ГРАМ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ МЕХАНИЧЕСКОГО ЛИЗИСА ПЕСКОМ

Горохов И.А., Гончаров Н.Е., Полев Д.Е.

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Выделение ДНК — это базовый этап большинства молекулярно-генетических исследований. Выделение ДНК из грам-положительных бактерий затрудняется из-за строения их клеточной стенки. Механический лизис, основанный на перетирании клеток с абразивом [Chisti, Moo-Young, 1986; Harrison, 1991; Shehadul Islam, Aryasomayajula, Selvaganapathy, 2017], является наиболее эффективным и широко применяемым методом клеточного лизиса в лабораторных условиях. В качестве абразива для лизиса бактериальных клеток обычно используют стеклянные микрошарики диаметром 0,1–0,2 мм [Gesiova, Bury, Jelen, 2002] заводского производства. Доступность данной продукции на территории Российской Федерации

в последнее время ограничена. В качестве более дешевой и доступной альтернативы микрошарикам заводского производства как абразив для механического лизиса можно применять обычный песок [Wolf, 1975]. Так, песок успешно применяли для лизиса клеток грибов [Cummings, Belcour, Grandchamp, 1979], растительных клеток [Arif и др., 2010], водорослей [Yee и др., 2018] и бактерий [Sahin, 2016]. В нашей работе мы подтвердили возможность применения песка в качестве абразива для механического лизиса при выделении бактериальной ДНК с использованием колонок из коммерческого набора.

Цели и задачи. Целью работы была проверка возможности использования песка в качестве абразива для механи-

ческого лизиса бактериальных клеток при выделении ДНК. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: (1) проверить влияние добавления этапа механического лизиса с песком на эффективность выделения ДНК на примере набора QIAamp DNA Mini Kit; (2) сравнить качество выделяемой таким образом ДНК со стандартным протоколом набора.

Материалы и методы. Перед использованием песок просеивали через сито с диаметром отверстия 0,2 мм, промывали проточной и дистиллированной водой, обрабатывали 10N NaOH, повторно промывали дистиллированной водой, сушили и подвергали термической обработке в сушильном шкафу при 180°C в течение 1 ч. Готовый песок разносили по 2 мл пробиркам для гомогенизации, по 0,2 г в каждую пробирку. Бактериальные культуры выращивали на кровяном агаре в течение ночи при температуре 37°C. Бактериальные клетки отдельных колоний собирали стерильной бактериологической петлей в одноразовые пробирки, содержащие буфер ATL, ресуспендировали и разделяли на 2 равные части. Первую половину использовали для выде-

ления ДНК по стандартному короткому протоколу набора, включавшим инкубацию ресуспендированных клеток с 20 мкл протеиназы К при 56°C в течение часа и последующими лизисом в лизирующем буфере и очисткой выделяемой ДНК на колонках из коммерческого набора; во второй половине применяли модифицированный протокол, отличавшийся от стандартного протокола дополнительным этапом гомогенизации с песком. В работе использовали три варианта модифицированного протокола для набора QIAamp DNA Mini Kit, отличавшихся составом буфера и режимами гомогенизации: гомогенизация проводилась в буфере ATL с добавлением 20 мкл протеиназы К или без протеиназы К. Для работы использовали прибор Bioprep-24 (Allsheng). Скорость вращения при обработке составляла 7 м/с. В отдельных случаях проводили очистку препаратов ДНК от РНК с помощью обработки РНКазой А. Контроль выделения ДНК включал флуориметрическое измерение концентрации и электрофоретическую оценку степени деградации.

Основные результаты

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕДСТАВЛЕНЫ В ТАБЛИЦЕ

Номер протокола	Особенности протокола	Средняя кратность увеличения выхода выделяемой ДНК по сравнению со стандартным протоколом	Степень деградации выделяемой ДНК
1	Гомогенизация в течение 1 минуты, с последующим добавлением протеиназы К и инкубацией	x4,3	Слабая
2	Гомогенизация в течение 5 циклов по 1 минуте с паузами в 30 секунд, с последующим добавлением протеиназы К и инкубацией	x88,3	Умеренная
3	Гомогенизация в течение 5 циклов по 1 минуте с паузами в 30 секунд в присутствии протеиназы К и последующей инкубацией	—	Слабая

При выделении геномной ДНК в буфере ATL из набора QIAamp DNA Mini Kit с гомогенизацией в течение 1 минуты (протокол 1) мы получили увеличение выхода ДНК в 4,3 раза со слабой степенью деградации (с помощью гель-электрофореза был визуализирован четкий бэнд, соответствующий высокомолекулярной фракции ДНК). При применении протокола 2 среднее увеличение выхода ДНК возросло до 88,3 раз, но наблюдалось усиление деградации ДНК (вместо четкого бэнда с высокомолекулярной фракцией ДНК был визуализирован шмер). Добавление протеиназы К в буфер ATL на этапе гомогенизации (протокол 3) позволило снизить уровень деградации выделяемой ДНК.

Заключение. Добавление этапа механического лизиса с песком увеличивает выход ДНК при выделении набором QIAamp DNA Mini Kit по сравнению с применением стандартного протокола набора, но способствует более сильной степени деградации ДНК, которую можно снизить за счет добавления протеиназы К в буфер на этап механического лизиса.

Список литературы

1. Arif I. A. и др. A Simple Method for DNA Extraction from Mature Date Palm Leaves: Impact of Sand Grinding and Composition of Lysis Buffer // IJMS. 2010. Т. 11. № 9. С. 3149–3157.
2. Chisti Y., Moo-Young M. Disruption of microbial cells

for intracellular products // Enzyme and Microbial Technology. 1986. Т. 8. № 4. С. 194–204.

3. Cummings D. J., Belcour L., Grandchamp C. Mitochondrial DNA from *Podospora anserina*: I. Isolation and characterization // Molec. Gen. Genet. 1979. Т. 171. № 3. С. 229–238.

4. Geciova J., Bury D., Jelen P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review // International Dairy Journal. 2002. Т. 12. № 6. С. 541–553.

5. Harrison S. T. L. Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products // Biotechnology Advances. 1991. Т. 9. № 2. С. 217–240.

6. Sahin F. Using Sand Particles for the Disruption of Cell Walls of Gram-Positive Bacteria and Mycobacteria // J Bacteriol Parasitol. 2016. Т. 07. № 05.

7. Shehadul Islam M., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods // Micromachines. 2017. Т. 8. № 3. С. 83.

8. Wolf H. A procedure for simultaneous preparation of large amounts of DNA and RNA by the use of potassium iodide gradients // Analytical Biochemistry. 1975. Т. 68. № 2. С. 505–511.

9. Yee W. и др. A simple and inexpensive physical lysis method for DNA and RNA extraction from freshwater microalgae // 3 Biotech. 2018. Т. 8. № 8. С. 354.

АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ОСНОВНЫХ КЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ *LISTERIA MONOCYTOGENES* НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 1947-2023 ГГ.

Кичемазова Н.В., Зайцев С.С., Лаврухин М.С., Ляпина А.М., Ларионова О.С., Федорова В.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» (Вавиловский университет), Саратов, Россия

Введение. В настоящее время листериоз рассматривают как одну из наиболее опасных и тяжелых пищевых инфекций, высокому риску заражения которой подвержены человек и животные, в первую очередь, с ослабленным иммунитетом. Возбудитель листериоза, бактерия *Listeria monocytogenes* (*Lm*), встречается повсеместно и обладает выраженной устойчивостью к изменениям внешних условий среды (4-45 °С, рН 5-11). Чаще всего заражение человека происходит алиментарным путем при употреблении контаминированных продуктов питания, в частности, продуктов животноводства, которые могут храниться в условиях холодильника длительное время (мясные, рыбные, молочные изделия). Наиболее часто встречающаяся форма листериоза — гастроэнтеритическая, клинически сходна с другими острыми кишечными инфекциями, однако более чем в 20% случаев она сопровождается развитием тяжелых инвазивных форм с высокой летальностью (до 100% при нейролистериозе). В последние годы эпидемиологическая ситуация по листериозу в мире и РФ продолжает оставаться напряженной. Молекулярно-генетические методы являются одними из важных инструментов эпидемиологического мониторинга листериозной инфекции. Метод мультилокусного секвенирования-типирования (MLST) применяется для идентификации, типирования и выявления закономерностей циркуляции штаммов *Lm*. Этот метод эффективен как в анализе изменчивости штаммов, так и в оценке их эпидемиологической значимости. Главным преимуществом MLST является сопоставимость результатов исследований, проводимых во всем мире, и объединение их в международную базу данных (БД).

Цель работы. Провести ретроспективный анализ основных молекулярно-генетических характеристик изолятов *Lm*, выделенных на территории РФ за 1947-2023 гг., доступных в международной базе данных PubMLST Paster.

Материалы и методы. Анализ MLST-характеристик изолятов *Lm* (клональный комплекс, СС, сиквенс тип, ST, генетическая линия) проводили на основе данных, полученных из международной базы PubMLST Paster (<https://bigsd.pasteur.fr/listeria/>) с учетом года и источника выделения изолятов на территории РФ.

Основные результаты. В ходе анализа данных была обработана информация об изолятах, выделенных на территории Российской Федерации с 1947 по 2023 гг. (n=311) (дата обращения 01.08.2023 г.). Все анализируемые изоляты принадлежали к гипервирулентным и вирулентным генетическим линиям — I (26,4%) и II (73,6%), соответственно. Из них большая часть изолятов была выделена из клинических образцов (36%), такое же количество (36,0%) выделено из продуктов питания, чуть меньше — из биоматериала животных (18,0%), остальные — из окружающей среды (10,0%). Анализ изолятов по основным характеристикам MLST показал принадлежность преобладающего количества к СС7 (17,7%), далее следовали представители СС37 (8,4%), СС8 (7,1%), СС121 (6,1%), СС315 (5,8%) и СС1 (5,5%). Изоляты *Lm*, принадлежащие к другим клональным комплексам, а именно, СС9, СС2, СС6, СС11, СС18, СС20, СС4, СС155, СС14, СС90, СС5, СС19, СС177, СС475, СС321, СС89, СС21, СС124, СС3, СС101, СС204, СС26, СС403, ST1365, СС29, СС489, СС288, СС59, СС31, ST1592, СС87 и СС415, составили менее 5,0% от общего количества. Поскольку СС7 оказался преобладающим на территории РФ, мы провели анализ частоты встречаемости изолятов, относящихся к указанному клональному комплексу, в источниках различного происхождения. Оказалось, что чаще всего (почти 50,0% штаммов) представители этого СС встречались у животных, примерно треть изолятов была выделена из клинических образцов, около 15,0% — из пищевых продуктов, и менее 2,0% — из окружающей среды (Таблица 1).

ТАБЛИЦА 1. ИСТОЧНИКИ ИЗОЛЯТОВ *LM*, ОТНОСЯЩИХСЯ К СС7, ПРЕОБЛАДАЮЩЕМУ НА ТЕРРИТОРИИ РФ С 1947 ПО 2023 ГГ.

Источник	Количество изолятов (n), N=55	
	n/N	%
Животные	26/55	47,3
Клинические изоляты	16/55	29,1
Пищевые продукты	9/55	16,4
Окружающая среда	1/55	1,8
Другое	3/55	5,4

Исходя из полученных результатов видно, что на территории РФ за 1947-2023 гг. преобладали изоляты Lm, принадлежащие к СС7, выделенные, в большинстве случаев, из биоматериала животных. Это свидетельствует о том, что животные подвержены высокому риску заражения листериями данного клонального комплекса и могут являться потенциальным источником заражения для человека.

Заключение. По результатам проведенных нами исследований, большинство изолятов Lm, выделенных на

территории РФ с 1947-2023 гг., относились ко II (вирулентной) генетической линии. Среди них преобладали представители СС7, выделенные из биоматериала животных. Наши результаты подтверждают данные о широком распространении Lm СС7 на территории РФ, а также свидетельствуют о необходимости активного мониторинга возбудителя листериоза не только у людей, но и у диких и сельскохозяйственных животных, как потенциального резервуара микроорганизмов, вызывающих кишечные инфекции.

УСТАНОВЛЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИЙ МЕЖДУ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ДНК УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ ФЛОРЫ СТЕНКИ КИШКИ И НАЛИЧИЕМ ОСЛОЖНЕНИЙ ДИВЕРТИКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ

Полуян О.С., Костюк С.А., Воробей А.В., Дыбов О.Г.

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

Введение. В настоящее время выявлены многочисленные факторы риска развития дивертикулярной болезни ободочной кишки, включая константные факторы, такие как возраст, пол и генетическая предрасположенность, и переменные факторы риска, такие как состояние микробиоты. Микрофлора кишечника, как один из факторов риска развития дивертикулярной болезни ободочной кишки, имеет существенные различия у пациентов с острым дивертикулитом в анамнезе, симптоматической неосложненной дивертикулярной болезнью, а также с другими кишечными заболеваниями.

Цель работы — определить пороговые значения концентраций ДНК условно-патогенной флоры в биоптатах стенки кишки для установления корреляции данного параметра с наличием осложнений у пациентов с дивертикулярной болезнью.

Материалы и методы. В исследование были включены образцы различного интраоперационного биологического материала: 35 биоптатов слизистой оболочки патологических участков неосложненных дивертикулов, 19 биоптатов слизистой оболочки патологических участков осложненных дивертикулов, 25 биоптатов инфильтратов брыжейки. Выделение ДНК проводили с использованием фенол-хлороформной экстракции («TRIzol», «Invitrogen», США) с использованием TissueLyser гомогенизатора II (Qiagen) для предварительной гомогенизации в течение 3 минут (частота 10/с). Оценку качества и количества выделенной ДНК оценивали спектрофотометрически. Молекулярно-генетическое исследование по выявлению и количественному определению ДНК условно-патогенной флоры аэробной этиологии семейства *Enterobacteriaceae*, рода *Staphylococcus species*, рода *Streptococcus species* проводили с использованием тест-системы «АмплиПрайм ФЛОРОСКРИН-Аэробы» (РФ). Детекцию результатов проводили в режиме реального времени с использованием программного обеспечения прибора «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия). Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.).

Все количественные данные имели не нормальное распределение и представлены в виде значений медианы и квартилей (Me (Q25/75)). Оценку предсказательной ценности предикторов и выбор их пороговых значений проводили с применением ROC-анализа с вычислением площади под кривой — AUC (area under the curve). Критическим принят уровень значимости $p < 0,05$.

Основные результаты. В ходе проведенных молекулярно-генетических исследований по определению количественных уровней (концентраций) ДНК условно-патогенной флоры аэробной этиологии установлено, что концентрации (Me (Q25/75)) ДНК семейства *Enterobacteriaceae* в биоптатах из неосложненных дивертикулов составили 9232 (7341/10761) копий/мл, в биоптатах из осложненных дивертикулов — 30678 (18996/37073) копий/мл, в биоптатах из инфильтратов брыжейки — 11577 (8266,5/17274,5) копий/мл.

Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило сделать вывод о наличии статистически достоверных различий для исследуемых групп: $Z = -5,063$ при $p < 0,001$ (для групп «неосложненный дивертикул-осложненный дивертикул»); $Z = -2,332$ при $p = 0,020$ (для групп «неосложненный дивертикул-инфильтрат брыжейки»); $Z = -4,656$ при $p < 0,001$ (для групп «осложненный дивертикул-инфильтрат брыжейки»).

Затем были произведены статистические расчеты по установлению влияния пороговых уровней концентраций ДНК семейства *Enterobacteriaceae* на риск формирования осложненных дивертикулов ободочной кишки.

Для установления порогового значения количественного предиктора «концентрация ДНК *Enterobacteriaceae*» был проведен ROC-анализ с определением AUC.

Установлено, что концентрация ДНК *Enterobacteriaceae* $7,4 \times 10^3$ копий/мл (т.е. точка отсечения) разделяет с чувствительностью 94,7% и специфичностью 74,3% (AUC = 0,920 (95% ДИ 0,810-1,031), $p < 0,001$) пациентов с дивертикулярной болезнью на две подгруппы: без осложненных дивертикулов и с осложненными дивертикулами.

Анализ значимости различий по частоте встречаемости признака оценивали с помощью критерия χ^2 в таблице сопряженности 2x2.

Относительный риск формирования осложненных дивертикулов составил $OR=9,771$ (нижняя-верхняя границы 95% ДИ 1,412-67,638) при $p<0,05$. Критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 9,573 при $p=0,002$, что свидетельствует о статистически достоверной значимости различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска. Критерий ϕ составил 0,462, что свидетельствует об относительно сильной связи между фактором риска и исходом. Отношение шансов для формирования осложненных дивертикулов в зависимости от концентрации ДНК *Enterobacteriaceae* составило 19,059 (нижняя-верхняя границы 95% ДИ 2,288-158,782) при $p<0,05$.

Концентрации (Ме (Q25/75)) ДНК рода *Streptococcus species* в биоптатах из неосложненных дивертикулов составили 9296 (7671/11159) копий/мл, в биоптатах из осложненных дивертикулов — 9413 (8460/11074) копий/мл, в биоптатах из инфильтатов брыжейки — 10404 (6995/13069) копий/мл.

Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило сделать вывод об отсутствии статистически достоверных различий для исследуемых групп: для групп «неосложненный дивертикул-осложненный дивертикул» $Z=-0,408$, $p=0,684$; для групп «неосложненный дивертикул-инфильтрат брыжейки» $Z=-0,937$, $p=0,349$; для групп «осложненный дивертикул-инфильтрат брыжейки» $Z=-0,865$, $p=0,387$.

Аналогичные данные, свидетельствующие об отсутствии статистически значимых достоверных различий,

были получены при определении концентраций ДНК *Staphylococcus species* в различном биологическом материале: в биоптатах из неосложненных дивертикулов концентрации ДНК составили 8438 (6804/10908) копий/мл, в биоптатах из осложненных дивертикулов — 10601 (9289/11171) копий/мл, в биоптатах из инфильтатов брыжейки — 10999 (7036/12827) копий/мл

Критерий Манна-Уитни составил: для групп «неосложненный дивертикул-осложненный дивертикул» $Z=-1,784$, $p=0,074$; для групп «неосложненный дивертикул-инфильтрат брыжейки» $Z=-1,672$, $p=0,095$; для групп «осложненный дивертикул-инфильтрат брыжейки» $Z=-0,628$, $p=0,530$.

Заключение. На основании проведенных молекулярно-генетических исследований установлены количественные микробиологические показатели бактериальной обсемененности различного вида биологического материала пациентов с дивертикулярной болезнью ободочной кишки. Показано отсутствие статистически значимых различий ($p>0,05$) в концентрациях ДНК рода *Staphylococcus species* и рода *Streptococcus species* для данных таксонов между исследуемыми группами. При этом определение концентраций ДНК семейства *Enterobacteriaceae* в биоптатах стенки кишки может рассматриваться в качестве диагностического маркера риска развития осложненной дивертикулярной болезни ободочной кишки. Установлено, что выявление в исследуемом биологическом материале ДНК семейства *Enterobacteriaceae* в концентрации более $7,4 \times 10^3$ копий/мл коррелирует с наличием осложнений дивертикулярной болезни ободочной кишки.

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ЭНТЕРОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА С ДИФФЕРЕНЦИАЦИЕЙ ЭНТЕРОВИРУСА 68 ТИПА

Полякова В.А.¹, Лупарев А.Р.¹, Давыдова Е.Е.¹, Шуряева А.К.¹, Толоконцева А.А.¹, Девятов А.А.¹, Гордукова М.А.², Шипулин Г.А.¹

¹ ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

² ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия

Введение. Энтеровирусная инфекция (ЭВИ) — повсеместно распространенное инфекционное заболевание, вызываемое вирусами рода *Enterovirus*, семейства *Picornaviridae*. Симптоматика ЭВИ может варьировать от субклинических форм и легкого протекания болезни до тяжелых неврологических состояний с летальными исходами. Среднепогодный уровень заболеваемости ЭВИ в РФ на протяжении 2010-2019 гг. составляет 7,02 случаев на 100 тыс. населения, причем удельный вес энтеровирусного менингита (ЭВМ) 30%. Преимущественно подвержены заболеваемости ЭВИ дети в возрасте до 17 лет. Как правило тяжелое течение ЭВИ связано с определенными штаммами энтеровирусов, так в последнее десятилетие зафиксированные вспышки ЭВМ были обусловлены циркуляцией штаммов эховирусов 6, 11, 13, 30, вируса Коксаки А9, энтеровируса А71 и др. [1, 2]. В настоящее время большую озабоченность вызывает энтеровирус D68 (EV-D68),

по данным CDC связанный с развитием острого вялого миелита у детей [3], однако в РФ отсутствуют данные о распространенности и значимости данного серотипа. В связи с этим изучение эпидемиологической ситуации в РФ по распространению различных серотипов энтеровирусов у детей с ЭВИ и разработка метода для выявления и дифференциации EV-D68 ввиду его клинической значимости для своевременной терапии имеют большое значение.

Цель и задачи. Изучение эпидемиологической ситуации в РФ по распространению различных серотипов энтеровирусов у детей с ЭВИ. Разработка качественной диагностической тест-системы для выявления РНК энтеровирусов А, В, С и D с дифференциацией EV-D68 в биологическом материале методом ОТ-ПЦР с гибридным флуоресцентной детекцией в реальном времени.

Материалы и методы. Были выбраны диагностические праймеры и зонды в 5'-нетранслируемой области

(5'-UTR) генома энтеровирусов. Для подбора праймеров использовались программа UGENE и интернет-ресурсы Integrated DNA Technologies, BLAST, Primer Blast.

Для ручного выделения РНК из биологического материала использовали набор «АмплиТест РИБО-преп», для экстракции в автоматическом режиме использовали набор «АмплиТест Магно-Сорб-Комбо» (ФГБУ «ЦСП ФМБА», Россия).

В качестве внутреннего контрольного образца (ВКО) использовали искусственно синтезируемую рекомбинантную последовательность РНК, заключенную в оболочку MS2-фага. В качестве положительного контрольного образца (ПКО) использовали рекомбинантную РНК, содержащую 5'-UTR участок генома энтеровируса. Концентрацию препаратов РНК измеряли методом капельной ПЦР с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, США). Для комплектации ОТ-ПЦР тест-системы использовали реагенты производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА. Аналитическую специфичность оценивали на панели РНК штаммов энтеровирусов и близкородственных вирусов. Диагностические характеристики оценивали при анализе клинического материала, собранного в период с октября 2021г. по ноябрь 2022г. ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ» г. Москвы.

Основные результаты. Праймеры и зонды были выбраны в области 5'-UTR консервативной для всех типов энтеровирусов, таким образом, чтобы исключить случайное выявление генетически близких к энтеровирусам риновирусов. Также отдельно были выбраны праймеры и зонд специфичные к геному EV-D68, имеющего большую клиническую значимость.

Предварительно 5'-UTR участок генома отечественных изолятов энтеровирусов (n=131) в области выбранных праймеров был отсеквенирован по методу Сэнгера, для того, чтобы учесть значимые полиморфизмы, также часть изолятов (n=43) отсеквенированы в области гена капсидного белка VP1. По результатам секвенирования выявлены РНК вирусов Коксаки А6 (n=58), А10 (n=29), А4 (n=7), А5 (n=5), А2 (n=2), В5 (n=2), А16 (n=1), В3 (n=1), эховирусов 9 (n=3), 6 (n=14), 11 (n=1), энтеровируса D68 (n=8).

Был разработан диагностический набор, представляющий собой мультиплексную ОТ-ПЦР в реальном времени, позволяющий детектировать ВКО по каналу FAM, РНК энтеровирусов А, В, С и D по каналу HEX с дифференциальным выявлением EV-D68 по каналу Cy5. Оптимизация набора реагентов производилась на амплификаторах: Rotor-Gene Q (QiAGEN, Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США), ДТпрайм («ДНК-технология», Россия). Было показано, что набор позволяет выявлять РНК энтеровирусов из мазков со слизистой носо- и ротоглотки, фекалий и спинномозговой жидкости (СМЖ) и имеет предел обнаружения $5 \cdot 10^4$ копий/мл. Оценка специфичности набора была проведена на панели штаммов энтеровирусов видов А (n=2), В (n=23), С (n=1), риновируса (n=7), пареховируса (n=2), аденовируса (n=9), коронавируса (n=1), респираторно-синцитиального вируса (n=3), вирусов гриппа А (n=8), В (n=1), С (n=1) и парагриппа (n=3), а также на ДНК человека. Было показано отсутствие перекрестных реакций. Высокие диагностические показатели набора оценивали на предварительно охарактеризованном клиническом материале (таблица 1).

ТАБЛИЦА 1. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Образцы	«АмплиСенс Enterovirus-FL», секвенирование кДНК	Результаты применения тестируемого набора реагентов			
		РНК EV (EV-D68)		Диагностическая	
		Обнаружена	Не обнаружена	Чувств-ть (ДВ 95%), в интервале	Специфич-ть (ДВ 95%), в интервале
Мазки (372)	252 содержат РНК EV, 8 содержат РНК EV-D68	252 (8)	0	99-100%	97-100%
	120 не содержат РНК EV	0	120		
Фекалии (210)	40 содержат РНК EV	40 (0)	0	91-100%	98-100%
	170 не содержат РНК EV	0	170		
СМЖ (119)	9 содержат РНК EV	9 (0)	0	66-100%	97-100%
	110 не содержат РНК EV	0	110		

Выводы. Проведен мониторинг по циркуляции штаммов энтеровирусов в период с 2021г. по 2022г. в г. Москва. Разработан набор реагентов на основе ОТ-ПЦР для выявления РНК энтеровирусов А, В, С и D с дифференциацией EV-D68 в различном клиническом материале. Показаны высокие аналитические и диагностические характеристики набора реагентов.

Список литературы:

1. Шостакович-Корецкая Л.Р. и др. Здоровье ребенка. 2016. №8 (76). С. 78-81. DOI: 10.22141/2224-0551.8.76.2016.90829.
2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в РФ в 2022 году: Государственный доклад. М.: Роспотребнадзор. 2023. С. 225-227.
3. Zhang, C. et al. Nature Communications. 2021. Vol. 12, № 2904. DOI: 10.1038/s41467-021-23199-5.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Левашова О.А.¹, Алексеева Н.Ю.¹, Голикова О.А.¹, Микуляк Н.И.², Журавлев Д.И.²

¹ ПИУВ — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Пенза, Россия

² Пензенский государственный университет, Пенза, Россия

Актуальность. В последние десятилетия распространенность аллергических заболеваний среди детей является значимой медико-социальной проблемой. Помимо генетической предрасположенности к развитию аллергопатологии, важный вклад могут вносить различные факторы, в том числе и нарушение состава кишечного микробиоценоза. Современные молекулярно-генетические методы исследования спектра микроорганизмов кишечника позволяют достаточно точно определить таксономическое положение микроорганизма, не требует строгих условий сбора, транспортировки и длительного времени исполнения.

Цель исследования: провести анализ особенностей микробиоты кишечника у детей с аллергическими заболеваниями с использованием современных молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы. Обследовано 20 детей в возрасте от 3 до 17 лет (12 мальчиков и 8 девочек) с атопическим дерматитом среднетяжелого течения в стадии обострения, аллергическим ринитом и бронхиальной астмой. У 7 детей атопический дерматит сочетался с аллергическим ринитом, у 3 — с бронхиальной астмой. В качестве контрольной группы обследовано 7 здоровых детей (3 мальчика и 4 девочки) в сопоставимом возрасте.

Количественное определение микробиоты кишечника (бифидобактерий, лактобацилл, кишечной палочки, а также условно-патогенных и патогенных микроорганизмов) проводилось методом ПЦР в режиме «реального времени» на амплификаторе «ДТ-96» («ДНК-технология», г. Москва) с использованием тест-систем «Колонофлор-16 (биоценоз)» («АльфаЛаб», г. Санкт-Петербург). Выделение ДНК из кала проводили наборами реагентов «Экспресс-ДНК-Био» («Алкор Био», г. Санкт-Петербург).

Результаты исследований. Несмотря на то, что состав микробиоты кишечника имеет значительную индивидуальную вариабельность, в ней присутствуют доминирующие микроорганизмы, на 80% представленные типами Bacteroidetes, Firmicutes и Actinobacteria. Клинически значимым является увеличение или снижение общего количества бактерий более чем на 2 порядка, относительно границы нормы. В обследованной группе детей как с аллергопатологией, так и у здоровых не обнаружено выраженного изменения общей бактериальной массы.

Изучение молекулярно-генетическими методами состава микробиоты кишечника у всех обследованных детей с аллергическими заболеваниями выявлено снижение концентрации *Lactobacillus spp.*, при этом в контрольной группе уменьшение количества этих микроорганизмов обнаружено только в одном случае. Известно, что лактобациллы относятся к грамположительным палочковидным бактериям и являются облигатной флорой кишечника. Редукция численности лактобацилл — один из признаков

кишечного дисбиоза, что способствует снижению противовирусной и противоаллергической защиты, нарушению ферментации лактозы. Экспериментально доказано, что эти микроорганизмы способны оказывать иммуномодулирующее действие: колонизация кишечника лактобациллами улучшала эпителиальный барьер и уменьшала сенсибилизацию к некоторым аллергенам [1]. Также показана эффективность применения некоторых пробиотических штаммов *Lactobacillus* у детей с атопическим дерматитом и аллергией на белок коровьего молока [2]. Следует отметить, что референсные интервалы используемой тест-системы относятся к более взрослым пациентам, в то время как в данном исследовании рассмотрены пациенты от 3 до 17 лет. Однако, поскольку по данным литературы содержание бифидо- и лактобактерий у детей повышено относительно взрослых [3], а в данном эксперименте количество этих бактерий ниже референсного интервала для взрослых, представленные результаты являются значимыми. Так, более чем в 50 % случаев (у 11 детей) отмечалось снижение *Bifidobacterium spp.*, что свидетельствует о выраженном дисбиозе кишечника. Однако анализ клинических данных обследованных пациентов с аллергопатологией не выявил связь между уменьшением концентрации ДНК бифидобактерий и коморбидностью. Известно, что данная группа микроорганизмов участвуют в регуляции моторики кишечника, обмену желчных кислот, осуществляют в синтезе витаминов, биологически активных веществ, аминокислот, а также препятствует росту и размножению в кишечнике представителей патогенной и условнопатогенной флоры. Ранее было показано снижение бифидобактерий у детей с аллергией на коровье молоко [4]. Анализ уровня ДНК *Bifidobacterium spp.* в биологическом материале контрольной группы не выявил изменений. При выраженном дисбиозе кишечника в трех случаях определялись представители *Escherichia coli*, обладающих патогенными свойствами (*Enteropathogenic E. coli*), а также *Proteus vulgaris*. У 25 % обследованных выявлялась *Clostridium perfringens*. Известно, что данные микроорганизмы в зависимости от штамма могут продуцировать токсины, влияющие на плотные контакты (клаудины) кишечника [5].

Предварительный анализ результатов исследований микробиоты кишечника детей с аллергическими заболеваниями подтверждает необходимость проведения дальнейших исследований в этой области.

Таким образом, количественная оценка микробиоты кишечника у детей с аллергопатологией выявила дисбиотические изменения, что проявилось преимущественно в снижении *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.*

Литература

1. Kozakova H., Schwarzer M., Tuckova L., Srutkova D., Czarnowska E., Rosiak I., Hudcovic T., Schabussova I.,

Hermanova P., Zakostelska Z., Aleksandrak-Piekarczyk T., Koryszewska-Baginska A., Tlaskalova-Hogenova H., Cukrowska B. Colonization of germ-free mice with a mixture of three lactobacillus strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization. *Cell. Mol. Immunol.* 2016. N 13(2). P. 251-62.

2. Cukrowska B., Ceregra A., Maciorkowska E., Surowska B., Zegadło-Mylik M.A., Konopka E., Trojanowska I., Zakrzewska M., Bierła J.B., Zakrzewski M., Kanarek E., Motyl I. The Effectiveness of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* Strains in Children with Atopic Dermatitis and Cow's Milk Protein Allergy: A Multicenter, Randomized, Double Blind, Placebo Controlled Study. *Nutrients.* 2021. N 13(4). P. 1169.

3. Ghosh T.S., Arnoux J., O'Toole P.W. Metagenomic analysis reveals distinct patterns of gut lactobacillus prevalence, abundance, and geographical variation in health and disease. *Gut Microbes.* 2020. N 12(1):1-19. doi: 10.1080/19490976.2020.1822729.

4. Fieten K.B., Totté J.E.E., Levin E., Reyman M., Meijer Y., Knulst A., Schuren F., Pasmans SGMA. Fecal Microbiome and Food Allergy in Pediatric Atopic Dermatitis: A Cross-Sectional Pilot Study. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2018. N 175(1-2). P. 77-84.

5. Vecchio A.J., Rathnayake S.S., Stroud R.M. Structural basis for *Clostridium perfringens* enterotoxin targeting of claudins at tight junctions in mammalian gut. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 2021. N 118(15): e2024651118.

УСЛОВНО-ПАТОГЕННАЯ ФЛОРА КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ ДИВЕРТИКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ, ЕЕ ОСЛОЖНЕНИЙ И РЕЦИДИВОВ

Полуян О.С., Костюк С.А., Воробей А.В., Дыбов О.Г.

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

Введение. В основе развития как неосложненной формы дивертикулярной болезни с клиническими проявлениями, так и осложненных ее форм, лежат воспалительные изменения в стенке дивертикулов. В зависимости от реактивных свойств организма и вирулентности инфекционного агента, воспаление может варьировать от незначительного отека жировой клетчатки до перфорации дивертикула с развитием перитонита.

Цель работы — установить микробиологические предикторы риска развития дивертикулярной болезни ободочной кишки, ее осложнений и рецидивов на основании данных проведенных молекулярно-генетических исследований.

Материалы и методы. Для установления микробиологических факторов риска развития дивертикулярной болезни, ее осложнений и рецидивов в исследование было включено 180 образцов различного интраоперационного биологического материала: 35 биоптатов слизистой оболочки патологических участков неосложненных дивертикулов, 19 биоптатов слизистой оболочки патологических участков осложненных дивертикулов, 1 биоптат края наружного свища, 25 биоптатов инфильтратов брыжейки, 55 биоптатов лимфоузлов, 37 биоптатов слизистой оболочки участков здоровой кишки без дивертикулов, а также 5 биоптатов стенки кишки и 3 образца биологической жидкости стенки кишки пациентов, оперированных по поводу рака ободочной кишки без признаков непроходимости и долихоколон (контрольный биологический материал). Выделение ДНК проводили с использованием фенол-хлороформной экстракции («TRIZol», «Invitrogen», США) с использованием TissueLyser гомогенизатора II (Qiagen) для предварительной гомогенизации в течение 3 минут (частота 10/с). Оценку качества и количества выделенной ДНК оценивали спектрофотометрически. Молекулярно-генетические исследования по выявлению ДНК *Herpes simplex virus I, II* типов,

Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus; ДНК условно-патогенной флоры аэробной этиологии семейства *Enterobacteriaceae*, рода *Staphylococcus species*, рода *Streptococcus species*; ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus species* проводили с использованием тест-систем «АмплиСенс» (РФ). Детекцию результатов проводили в режиме реального времени с использованием программного обеспечения прибора «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия). Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Критическим принят уровень значимости $p < 0,05$.

Основные результаты. На основании проведенных молекулярно-генетических исследований установлено, что микробное инфицирование возбудителями бактериальной этиологии характерно в равной степени для осложненных и неосложненных дивертикулов, а также для инфильтратов брыжейки. Тем не менее, для указанных локализаций выявлены некоторые различия: в биоптатах из неосложненных дивертикулов и инфильтратов брыжейки бактериальные агенты выявляются как в моно-, так и в микст-состоянии; тогда как в биоптатах из осложненных дивертикулов возбудители выявляются только в виде ассоциаций. Микробный фактор вирусной этиологии был выявлен в биоптатах лимфоузлов (как в виде моно-инфекции, так и в составе ассоциаций), а также в биоптатах неосложненных дивертикулов в ассоциации с бактериальным микробным фактором.

В ходе проведенных молекулярно-генетических исследований по определению микробного спектра инфицирования тканей ободочной кишки было установлено, что бактериальные возбудители в виде моно-инфекции были обнаружены в биологическом материале из не-

осложненных дивертикулов, тогда при в биоптатах из осложненных дивертикулов детектировалось сочетанное бактериально-вирусное инфицирование.

На основании указанного факта нами было выдвинуто предположение о возможном влиянии микст-инфицирования бактериально-вирусной этиологии стенки кишки на риск развития осложнений дивертикулярной болезни. Анализ значимости различий по частоте встречаемости признака оценивали с помощью критерия χ^2 в таблице сопряженности 2x2.

Относительный риск развития осложнений дивертикулярной болезни ободочной кишки составил $OR=15,658$ (нижняя-верхняя границы 95% ДИ 4,041-60,675) при $p<0,05$. Критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 34,301 при $p<0,001$, что свидетельствует о статистически достоверной значимости различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска. Критерий ϕ составил 0,838, что свидетельствует об очень сильной связи между фактором риска и исходом. Отношение шансов для формирования осложненной дивертикулярной болезни при микст-инфицировании бактериально-вирусными патогенами в виде ассоциаций составило 140,250 (нижняя-верхняя границы 95% ДИ 18,137-1084,535) при $p<0,05$. Показатель диагностической чувствительности теста составил 89,47%, диагностической специфичности — 94,28%, предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов — 89,47% и 94,28% соответственно.

В ходе проведенных молекулярно-генетических исследований также было установлено, что в ряде случаев наблюдается сочетанное инфицирование тканей кишки бактериальными возбудителями и лимфоузлов мезоколона вирусными патогенами; при этом ДНК исследуемых вирусов в тканях кишки не детектируется.

На основании указанного факта нами было выдвинуто предположение о возможном влиянии вирусов на риск формирования рецидивов дивертикулярной болезни.

Анализ значимости различий по частоте встречаемости признака оценивали с помощью критерия χ^2 в таблице сопряженности 2x2.

Относительный риск развития рецидивов дивертикулярной болезни ободочной кишки составил $OR=13,200$ (нижняя-верхняя границы 95% ДИ 3,433-50,752) при $p<0,05$. Критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 33,444 при $p<0,001$, что свидетельствует о статистически достоверной значимости различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска. Критерий ϕ составил 0,817, что свидетельствует об очень сильной связи между фактором риска и исходом. Отношение шансов для формирования рецидивов дивертикулярной болезни при вирусном инфицировании лимфоузлов мезоколона составило 102,667 (нижняя-верхняя границы 95% ДИ 15,755-669,029) при $p<0,05$. Показатель диагностической чувствительности теста составил 91,67%, диагностической специфичности — 90,32%, предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов — 88,00% и 93,33% соответственно.

Заключение. На основании проведенных молекулярно-генетических исследований по оценке транслокации микрофлоры в слизистую оболочку и лимфоузлы мезоколона установлено, что микст-инфицирование стенки кишки патогенами бактериально-вирусной этиологии повышает риск развития осложнений дивертикулярной болезни в 140,250 раз; а присутствие условно-патогенной флоры в тканях кишки в сочетании с вирусным поражением лимфоузлов мезоколона приводит к увеличению риска рецидивирования дивертикулярной болезни в 102,667 раза. Рассчитанные высокие показатели диагностической чувствительности и специфичности, предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов позволяют рекомендовать применение молекулярно-диагностических тестов по выявлению ДНК патогенных микроорганизмов бактериальной и вирусной этиологии в биоптатах тканей кишки в клинической практике.

РАЗРАБОТКА И ТЕСТИРОВАНИЕ МЕТОДИКИ ДЛЯ ПРОФИЛИРОВАНИЯ РЕПЕРТУАРА Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Сикамов К.В.^{1,2}, Горбачев А.Ю.¹

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

² Московский физико-технический институт (НИУ), Москва, Россия

Введение. Т-клеточные рецепторы (TCR) представлены двумя белковыми цепями: TCR α и TCR β . Эти цепи кодируются локусами генетических сегментов V, D, J и C генома. С помощью механизма VDJ рекомбинации, эти сегменты объединяются в определенных комбинациях в матричной РНК. Среди всех областей транскрипта TCR особое значение имеет регион CDR3, так как именно он определяет способность Т-лимфоцитов к специфическому распознаванию антигенов, что является центральным элементом функционирования иммунной системы организма.

Актуальность. Репертуар TCR может играть ключевую роль в диагностике и разработке потенциальных ме-

тодов лечения различных аутоиммунных, онкологических и других заболеваний. Так например, обзорной статье [1] освещается иммунный ответ на цитомегаловирус (CMV) и большое разнообразие его антигенов. Несмотря на то, что наша иммунная система не может полностью устранить CMV, она эффективно противостоит его механизмам уклонения. В этой борьбе критическую роль играют Т-клетки с уникальными последовательностями в регионе CDR3 мРНК, связанными с CMV. Это разнообразие антигенов и особенности иммунного ответа акцентируют внимание на важности разработки методик диагностики и таргетного лечения на основе TCR.

Цель. Таким образом, в данной работе ставится цель: разработать и реализовать новую методику для исследования репертуара клонотипов Т-клеточных рецепторов (TCR), а также провалидировать данный метод на образце от пациента с выявленной хронической CMV инфекцией.

Методы. Tcr секвенирование. Для исследования клонотипов Т-клеток в образцах периферической крови пациентов с БК была разработана панель для целевого обогащения кДНК последовательностями генов Т-клеточных рецепторов для технологии секвенирования MGISEQ. Процесс приготовления кДНК библиотеки [2] начинается с разделением центрифугированием в градиенте плотности (Фиколл, “ПанЭко”) мононуклеарных периферических клеток крови (PBMCs, включающих лимфоциты), из которых выделяется РНК при помощи тризола (ExtractRNA, “Евроген”). Далее, подготовленные образцы РНК, применяются в качестве матрицы для синтеза кДНК во время обратной транскрипции. Затем, используется Template Switch Oligos (TSO) — последовательность олигонуклеотидов, которая гибридизуется с дезоксирибонуклеотидами, добавленными вне матрицы РНК в силу особенности Mint-ревертазы (“Евроген”), а именно ее способности после завершения синтеза молекулы кДНК, внематрично присоединять к ее 3'-концу от 3 до 5 цитозинов. На завершительных стадиях вводятся технические последовательности олигонуклеотидов — адаптеры, для секвенирования образцов на платформе MGISEQ-2000 — при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), осуществляемой Tersus ДНК-полимеразой (“Евроген”), с in silico подобранными олигонуклеотидами на основе известных последовательностей не вариабельных доменов TCR генов. Итоговые библиотеки секвенируются на платформе MGISEQ-2000 с использованием PE-150 химических реагентов.

Методы. Биоинформатический анализ. Данные,

полученные в ходе секвенирования, подвергаются первичной обработке с помощью Trimmomatic и контролю качества через FastQC. Затем последовательности TCR выравниваются и собираются с помощью программы MiXCR («MiLaboratories»). Завершающие этапы включают статистический анализ и визуализацию данных с использованием языка R и специализированных пакетов, таких как Immunarch.

Для определения мотивов в последовательностях CDR3 наиболее распространенных клонотипов применяется база данных VDJdb.

Результаты. Описанная методика была успешно протестирована на образце крови от пациента с хронической CMV инфекцией, которая подтверждается альтернативным тестом крови (антитела IgM к CMV: 0,15; IgG: 16,4). Результаты, представленные в таблице 1, показывают большое разнообразие клонотипов: 5323 для альфа-цепи и 3227 для бета-цепи и другие технические характеристики, которые соответствуют техническим характеристикам методов опубликованных ранее [3]. Полученные данные также позволяют идентифицировать наиболее распространенные клонотипы в общем репертуаре. Анализ аминокислотной последовательности CDR3 региона клонотипов TCR с использованием онлайн-сервиса VDJdb указывает на возможность распознавания ими антигенов, ассоциированных с CMV инфекцией. Также стоит отметить, что метод разработан для секвенирования на китайской платформе MGISEQ-2000, рекомендованная длина вставки для которого с использованием химических реагентов PE-150 предполагается равной 400 п.н., в данном же случае длина вставки составляла порядка 500 п.н. и секвенирование прошло успешно, что является важным техническим результатом полученным в данной работе.

ТАБЛИЦА 1. ОБЩАЯ СТАТИСТИКА ДЛЯ ИССЛЕДОВАННОГО ОБРАЗЦА И ПЕРВЫЕ ДВА НАИБОЛЕЕ ПЕРЕПРЕДСТАВЛЕННЫЕ КЛОНОТИПА ДЛЯ А И В ЦЕПЕЙ TCR

цепь TCR	объем крови (мл)	масса РНК (мкг)	масса ДНК библиотеки (нг)	процент целевых (VDJ) чтений (%)	кол-во целевых (VDJ) чтений	кол-во транскриптов с уникальным UMI	кол-во уникальных клонотипов
α	2	2	131	70,78	3141725	7556	5323
β	2	2	151	36,58	2213526	5096	3827

цепь TCR	аминокислотная последовательность CDR3 клонотипа	кол-во клонов в образце	представленность клонотипа (%)
α	CVVSDQGFQKLVF*	350	4,63
	CAYWPDMRF	62	0,82
β	CASSAHGEGEQYF	146	2,86
	CASSYSDSGGNQPQHF	80	1,57

* — выделенные аминокислоты указывают на мотивы, ассоциированные с CMV

Выводы. Была разработана и успешно применена методика для анализа репертуара клонотипов Т-клеточных рецепторов (TCR). Ее эффективность была доказана на образце от пациента с хронической CMV, что подчеркивает ее потен-

циал для дальнейших исследований в области диагностики и выявления терапевтических мишеней различных заболеваний, ассоциированных с репертуаром TCR. Отмечены ключевые преимущества данного метода: интеграция техниче-

ских последовательностей, включая баркоды и уникальные молекулярные идентификаторы, через ПЦР без необходимости лигирования, а также возможность секвенирования на платформе MGISEQ с вставками более 400 п.н.

Список использованных источников:

1. La Rosa, C., & Diamond, D. J. (2012). The immune response to human CMV. *Future virology*, 7(3), 279–293.
2. Mamedov, I. Z., Britanova, O. V., Zvyagin, I. V., Turchaninova, M. A., Bolotin, D. A., Putintseva, E. V., Lebedev, Y. B., & Chudakov, D. M. (2013). Preparing unbiased T-cell receptor

and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Frontiers in immunology*, 4, 456.

3. Barennes, P., Quiniou, V., Shugay, M., Egorov, E. S., Davydov, A. N., Chudakov, D. M., Uddin, I., Ismail, M., Oakes, T., Chain, B., Eugster, A., Kashofer, K., Rainer, P. P., Darko, S., Ransier, A., Douek, D. C., Klatzmann, D., & Mariotti-Ferrandiz, E. (2021). Benchmarking of T cell receptor repertoire profiling methods reveals large systematic biases. *Nature biotechnology*, 39(2), 236–245. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0656-3>

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОТАВИРУСОВ: ДОМИНИРОВАНИЕ РЕАССОРТАНТНОГО ВАРИАНТА В НИЖНЕМ НОВГОРОДЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ С ВАКЦИННЫМИ ШТАММАМИ

Сашина Т.А., Морозова О.В., Великжанина Е.И., Епифанова Н.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А.

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Актуальность. По расчётам, каждый ребенок в мире к пяти годам сталкивается с ротавирусом А (РВА, *Rotavirus A*, сем *Sedoreoviridae*). Благодаря сегментированному геному, ротавирусы обладают большим генетическим разнообразием и способны к генерации новых вариантов. В мире отмечают широкое распространение реассортантных штаммов генотипов G1P[8], G3P[8], G8P[8] и G9P[8], которые имеют смешанный набор генов двух основных генотипов РВА. Они не могут быть выявлены с помощью рутинного G/P-типирования. В России ротавирусная инфекция (РВИ) остается актуальной проблемой, в 2022 году показатель заболеваемости составил 61,7 на 100 тыс. населения. В нашей стране доступны 2 пентавалентные вакцины, которые были зарегистрированы в 2012 и 2021 годах. Последняя содержит штаммы, полученные путем реассортации ротавирусов человека и крупного рогатого скота. Гены, кодирующие белок VP7, они получили от штаммов, выделенных от людей (D, DS-1, P, ST3, AU32). Охват детского населения вакцинацией в России остается низким, и в 2022 году составил 7,15 %, что подчеркивает актуальность изучения ротавирусов в нашей стране.

Целью работы явилась молекулярная характеристика ротавирусов, циркулирующих в Нижнем Новгороде, и их сравнение со штаммами D, DS-1, P, ST3 и AU32 в области антигенных эпитопов белка VP7. Материалы и методы. Использовали ротавирус-положительные образцы от детей, госпитализированных с диагнозом ОКИ в инфекционный стационар Нижнего Новгорода в январе — декабре 2022 года. G– и P-генотипы ротавирусов определяли методом мультимплексной ПЦР. Реассортантные штаммы выявляли с применением ПЦР для определения I– и E-генотипа и электрофореза РНК в полиакриламидном геле. Последовательности гена VP7 длиной 888 н.о. секвенировали на приборе Нанофор 05 (Синтол, Россия). Нуклеотидные и выведенные аминокислотные последовательности выравнивали и анализировали в MEGA X. Филогенетический анализ ротавирусов проводили в BEAST 1.8. В общую выборку взяли последовательности ротавирусов из России — Нижнего

Новгорода (112), Москвы (52), Новосибирска (31) — и других стран (21).

Результаты. В нижегородской популяции было определено 11 комбинаций G– и P-генотипов ротавирусов: G1P[8], G2P[4], G2P[8], G3P[4], G3P[6], G3P[8], G3P[9], G4P[8], G8P[8], G9P[8] и G9P[4]. Преобладали штаммы генотипа G3P[8] (52,4%), за которыми следовали ротавирусы генотипа G9P[8] (11,5%). Доля ротавирусов каждого из генотипов G1P[8], G2P[4], G3P[4], G8P[8] и G9P[4] составила менее 3,0%. Долевой вклад генотипов G2P[8], G3P[6], G3P[9] и G4P[8] в сумме был 2,3%. У 24,6 % штаммов был определен только P-генотип. В 83,5 % случаев штаммы генотипа G3P[8] имели генотип I2-E2, «короткий» профиль миграции сегментов генома в ПААГ и, следовательно, являлись реассортантными. Подобные ротавирусы являются эпидемиологически значимыми во всем мире, отмечено их доминирование в Австралии (37,6%), Индонезии (70,8%), Таиланде (89,8%) и Вьетнаме (27%).

На филогенетическом дереве ротавирусы из Нижнего Новгорода, Москвы и Новосибирска, циркулировавшие в 2017–2022 гг., вошли в состав 12 кластеров, находящихся в пределах разных филогенетических линий и сублиний внутри генотипов G1, G2, G3, G4, G6, G8, G9 и G12. При этом, штаммы D (G1), DS-1 (G2), P (G3), ST3 (G4) и AU32 (G9), входящие в вакцину 2021 года, группировались обособленно. Они были выделены в 1974–1985 годах и имеют достаточно низкий уровень сходства нуклеотидных последовательностей с современными российскими ротавирусами (62,6–96,1 % для разных штаммов).

VP7 является одним из основных белков, к которому в организме человека образуются вирус-нейтрализующие антитела. Он имеет на своей поверхности антигенные эпитопы, которые формируются за счет его конформации. В данных участках ротавирусы из Нижнего Новгорода, Москвы и Новосибирска, гомотипичные вакцинным, имели от 3 до 6 замен аминокислот (таблица). Штаммы других генотипов имели большее количество замен — от 10 до 19. По-

мимо антител, формированию протективного иммунитета при РВИ способствуют Т-клетки. Для белка VP7 установлены Т-клеточные эпитопы в регионах 16-28 а.о. и 40-52 а.о. В этих областях гомотипичные вакцинным российские штаммы имели от 1 до 4 замен аминокислот, гетеротипичные — от 10 до 16 замен. Число таких различий находится на уровне, ранее показанном нами для российских штаммов в сравнении с компонентами пятивалентной вакцины, зарегистрированной для применения в России в 2012 году. Эти результаты согласуются с данными из других стран (Катар, Китай, Сербия, Словения, США). Также в литературе имеются сведения, что эффективность вакцин против ротавирусов разных генотипов варьирует от 64 до 90 %. Это указывает на актуальность вакцинных штаммов для профилактики ротавирусной инфекции, несмотря на давний срок их выделения и значительное количество аминокислотных замен.

стрированной для применения в России в 2012 году. Эти результаты согласуются с данными из других стран (Катар, Китай, Сербия, Словения, США). Также в литературе имеются сведения, что эффективность вакцин против ротавирусов разных генотипов варьирует от 64 до 90 %. Это указывает на актуальность вакцинных штаммов для профилактики ротавирусной инфекции, несмотря на давний срок их выделения и значительное количество аминокислотных замен.

ТАБЛИЦА. ЗАМЕНЫ АМИНОКИСЛОТ В АНТИГЕННЫХ ЭПИТОПАХ БЕЛКА VP7 У РОССИЙСКИХ РОТАВИРУСОВ

Штаммы	Замены в конформационных В-клеточных эпитопах	Замены в Т-клеточных эпитопах
Штамм D, G1 Российские PBA, G1-I-A	5	2
Российские PBA, G1-II-C	3	2
Штамм DS-1, G2 Российские PBA, G2-IVa-1	6	1
Российские PBA, G2-IVa-3	4	3
Штамм P, G3 Российские PBA, G3-I	6	4
Российские PBA, G3-3-e	3	2
Штамм ST3, G4 Российские G4-I-C	5	4
Штамм AU32, G9 Российские PBA, G9-III-d	4	3
Российские PBA, G9-VI-e	3	3
Российские PBA, G6-I	15-19	10-15
Российские PBA, G8-IV	10-19	11-15
Российские PBA, G12-III	13-19	11-16

Выводы. Показано доминирование реассортантного варианта PBA генотипа G3P[8] в Нижнем Новгороде в 2022 году. В сравнении с вакцинными штаммами современные

российские ротавирусы имели от 3 до 19 замен в конформационных В-клеточных эпитопах белка VP7 и от 1 до 16 замен в Т-клеточных эпитопах.

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРНОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДА *AEROMONAS VERONII* МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (LAMP)

Феоктистова Н.А., Минаева А.Н, Мاستиленко А.В., Богданов И.И., Ломакин А.А, Нафеев А.А.

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина (ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ), Ульяновск, Россия

Актуальность. *Aeromonas veronii* — граммотрицательные палочковидные подвижные бактерии, обитающие преимущественно в пресноводных водах. Этот вид является возбудителем заболеваний у рыб, также является патогеном человека, вызывающим, главным образом, гастроэнтериты различной степени тяжести, а также часто выявляемым бактериальным агентом у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.

Цель исследований — разработать праймер-

ная тест-система для детекции представителей вида *Aeromonas veronii* методом петлевой изотермической амплификации (LAMP). Задачи исследований: провести поиск *in-silico* таргетного участка генома, выполнить дизайн видоспецифичных праймеров, подобрать параметры постановки реакции, проверить специфичность, определить чувствительность разработанного протокола для идентификации вышеназванных бактерий.

В работе были использованы референс-штаммы

Aeromonas: *A. salmonicida* ATCC 33568, *A. caviae* ATCC 15468, *A. veronii* ATCC 9071, *A. hydrophila* ATCC 49140) и 16 полевых штаммов *A. veronii*, выделенных коллективом авторов из объектов санитарного надзора.

Материальное обеспечение экспериментов: ДНКполимераза Bst 3.0 (New England Biolabs, UK), буфер для изотермической амплификации II (New England Biolabs, UK), вода, свободная от нуклеаз (New England Biolabs, UK), 2,0% агарозный гель.

Методы. Для разработки праймеров в качестве консервативного участка генома бактерии *A. veronii* был произведен поиск *in-silico*. Целевым участком выбран ген, кодирующий белок наружной мембраны (*ompA*). Конструирование праймеров LAMP проводили при помощи Explore V5 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>).

Реакцию LAMP проводили в 25 мкл. смеси, в состав которой входили по 0.2 мкл каждого из праймеров F3/B3 (25x), по 16 мкл. каждого из праймеров BIP и FIP (10 x) каждого, по 0,4 мкл. каждого из праймеров F1c и B1c (10x), ДНК-полимераза Bst 3.0 — 1 мкл, 1x ,буфер для изотермической амплификации II объемом 2,5 мкл, по 1,4 mM каждого. Пробу ДНК вносили в объеме 5 мкл. Смесь инкубировали при 62° в течение 60 минут. Продукты изотермической петлевой амплификации детектировали с помощью электрофореза в 2,0% агарозном геле, электрофорезирование проводили при 100 В. Детекцию результатов проводили при помощи геледокументирующей станции Bio-print CX4 Edge (Vilber, Франция) при УФ-свете с длиной волны 312 нм.

Выводы. Результаты проведенных исследований по подбору LAMP тест-системы систематизированы в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ LAMP ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *AEROMONAS VERONII*

Название праймер	Тип праймера	Сиквенс (5'→3')
F3	Прямой внешний праймер	GACTGCCAAGCTCTCCGA
B3	Обратный внешний праймер	AGCACGTCAGAGCTCAGG
FIP	Прямой внутренний праймер	CTCATGTCGCTCTCCCAGGTTT-AGGCACGCTACCGCTATC
BIP	Обратный внутренний праймер	CCGCACCTCTTATGTTGCCCC-GCGAAGTTCTTGTGCGACCAG
F1c	Прямой петлевой праймер	CTCATGTCGCTCTCCCAGGTTT
B1c	Обратный петлевой праймер	CCGCACCTCTTATGTTGCCCC

В результате исследований нами была разработана тест-система для детекции представителей вида *Aeromonas veronii* методом петлевой изотермической амплификации (LAMP). Сконструированная LAMP тест-система является специфичной, что доказано тем, что не один из других представителей рода не давал положительный результат после проведения протокола LAMP полученной из других бактерий. Специфичность подобранных праймеров была определена так же и на шестнадцати полевых штаммах *Aeromonas veronii* выделенных из объектов санитарного надзора, находящихся на территории Ульяновской области. Все подлежащие идентификации штаммы,

идентифицированные ранее коллективом авторов как представители вида *Aeromonas veronii* бактериологическим методом, дали положительный результат. Так же доказана высокая степень чувствительности предложенного нами метода детекции, которая составила 102 бактериальных геномов на 1 мл.

Полученные данные будут использованы в дальнейшей работе для создания протокола проведения LAMP в режиме «реального времени». Исследование выполнено согласно тематическому плану-заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 1022040900062-2-1.6.2.

ПЕРСПЕКТИВЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Толоконцева А.А.¹, Шуряева А.К.¹, Давыдова Е.Е.¹, Полякова В.А.¹, Лупарев А.Р.¹, Девятов А.А.¹, Гордукова М.А.², Шипулин Г.А.¹

¹ ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

² ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ»

Введение. Развитие молекулярных методов упростили идентификацию возбудителей кишечных инфекций, обеспечивая высокую чувствительность и специфичность выявления [1, 2]. Необходимость быстрого реагирования при лечении кишечных инфекций указывает на важность создания не только надежных, но вместе с тем и быстрых

диагностических тестов, таких как изотермическая петлевая амплификация LAMP, позволяющая сократить время реакции до 15-30 минут. Вариабельность генома некоторых возбудителей кишечных инфекций, таких как норовирусы и ротавирусы, является фактором, ограничивающим применение LAMP для их диагностики из-за необходи-

мости использования большого набора праймеров, охватывающих протяженный участок генома. Однако, для выявления возбудителей инфекций, имеющих достаточно консервативные участки генома, таких как *Salmonella*, *Shigella*/EIEC, *Campylobacter*, *adenoviruses* LAMP может стать хорошим диагностическим инструментом, в том числе в перспективе для реализации тестов у постели больного. В связи с этим актуальной задачей является разработка методики для выявления возбудителей кишечных инфекций *Shigella* spp/EIEC, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, Human *adenoviruses* F методом петлевой изотермической амплификации с флуоресцентной детекцией.

Цель и задачи. Разработка качественной и высокочувствительной диагностической тест-системы для выявления возбудителей кишечных инфекций *Shigella* spp/EIEC, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, Human *adenoviruses* F методом петлевой изотермической амплификации с флуоресцентной детекцией.

Материалы и методы. Были выбраны диагностические праймеры и зонды в области гена *ipaH* для *Shigella*/EIEC, для термофильных *Campylobacter* spp в области гена CJE0832, ген гексон был выбран для Аденовирусов группы F и ген *InvA* для *Salmonella* spp. Для множественного выравнивания целевых последовательностей возбудителей ОКИ *Shigella* spp., *Salmonella* spp., энтероинвазивных *E. coli*, *Campylobacter* spp, Human *adenoviruses* F использовали программу Mega X, алгоритм Clustal W. LAMP-праймеры были подобраны с использованием Primer Explorer V (Fujitsu, Япония) и ресурса поиска гомологичных последовательностей NCBI BLAST.

Для ручного выделения нуклеинового материала из осветленного экстракта фекалий использовали набор АмплиТест РИБО-преп (ФГБУ ЦСП ФМБА, Россия). В качестве внутреннего контрольного образца (ВКО) использовали искусственно синтезируемую рекомбинантную последовательность ДНК, заключенную в оболочку λ-бактериофага. В качестве положительного контроля LAMP использовали смесь плазмид, содержащих фрагменты ДНК *Salmonella* spp., *Shigella* spp./*E.coli*, *Campylobacter* spp. и аденовирусов группы F. Концентрацию препаратов ДНК измеряли методом капельной ПЦР с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, США). Для комплектации тест-системы на основе LAMP использовали реагенты производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА. Аналитическую специфич-

ность оценивали на панели ДНК штаммов целевых инфекций, а также близкородственных вирусов и бактерий.

Диагностические характеристики оценивали при анализе клинического материала, собранного в период с.2022г. по 2023г. ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ» г. Москвы. Наличие ОКИ в клинических образцах от пациентов подтверждали с помощью зарегистрированного ПЦР набора АмплиСенс ОКИ-скрин-FL.

Основные результаты. После подбора праймеров на целевые участки мишеней, были оптимизированы условия LAMP для проведения амплификации в мультиплексном формате. В одной пробирке проходит амплификация ДНК Human *adenoviruses* F по каналу HEX и ДНК *Salmonella* spp по каналу ROX, а в другой пробирке амплифицируется ДНК *Shigella* spp по каналу HEX, ДНК *Campylobacter* spp каналу ROX и ДНК контрольного образца экстракции (λ-бактериофага) каналу FAM. Оптимизация условий амплификации была достигнута за счет снижения концентрации олигонуклеотидов в реакционных смесях, так как использование моноплексных концентраций приводило к значительному замедлению LAMP. Выбранные оптимальные соотношения праймеров для мультиплексной LAMP амплификации позволили достичь замедления реакции не более чем на не более 2-5 минут для всех ДНК мишеней с сохранением неискаженной экспоненциальной формы, при сравнении с моноплексным форматом. Оптимизация набора реагентов производилась на амплификаторах: Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США), ДТпрайм («ДНК-технология», Россия). Было показано, что набор позволяет выявлять ДНК возбудителей кишечных инфекции *Salmonella* spp., *Shigella* spp., энтероинвазивных *E.coli*, термофильных *Campylobacter* spp. и аденовирусов группы F методом изотермической амплификации из осветленного экстракта фекалий и имеет предел обнаружения $5 \cdot 10^3$ копий/мл для всех показателей. Для проверки специфичности использовали различные аденовирусные и бактериальные штаммы, а также ДНК человека. Было показано отсутствие перекрестных реакций. Высокие диагностические характеристики набора оценивали на предварительно охарактеризованном клиническом материале (таблица 1). Наличие *Salmonella* spp., *Shigella* spp., энтероинвазивных *E.coli*, термофильных *Campylobacter* spp. и аденовирусов группы F в 80 клинических образцах от пациентов подтверждали с помощью зарегистрированного ПЦР набора АмплиСенс ОКИ-скрин-FL.

ТАБЛИЦА 1. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

ДНК мишень	«АмплиСенс ОКИ скрин-FL»	Результаты применения тестируемого набора реагентов			
		Обнаружена ДНК	Не обнаружена ДНК	Специфичность Интервал, % (p=95%)	Чувствительность Интервал, % (p=95%)
Human <i>adenoviruses</i> F	31 (80)	30 (80)	50(80)	92.8 100.0	83.8 — 99.9
<i>Salmonella</i>	19(80)	19(80)	61(80)	94.2 100.0	81.5 — 100.0
<i>Shigella</i>	12 (80)	12 (80)	68 (80)	94.6 100.0	75.3 — 99.9
<i>Campylobacter</i>	19 (80)	18 (80)	62(80)	94.2 100.0	72.7 — 99.9

Выводы. Разработан диагностический набор реагентов для выявления возбудителей кишечных инфекций *Shigella* spp/EIEC, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, Human adenoviruses F методом петлевой изотермической амплификации с флуоресцентной детекцией. Показаны высокие аналитические и диагностические характеристики набора реагентов.

1. Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as

causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol.* 2006 Sep;44(9):3189-95. doi: 10.1128/JCM.00915-06. PMID: 16954246; PMCID: PMC1594742.

2. Gallichan S, Perez-Sepulveda BM, Feasey NA, Hinton JCD, Thomas J, Smith AM. Multiplex PCR Assay for Clade Typing of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Microbiol Spectr.* 2022 Dec 21;10(6): e0318222. doi: 10.1128/spectrum.03182-22. Epub 2022 Nov 21. PMID: 36409092; PMCID: PMC9769638.

Раздел 6. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ОСОБО ОПАСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

СОХРАНЕНИЕ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В МИКРОКОСМАХ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

С.В. Титова, А.А. Герасименко, Е.А. Меньшикова, С.О. Водопьянов., Н.А. Селянская

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Вопрос сохранения и выживания холерных вибрионов в водоёмах имеет большое практическое значение, поскольку сохранение патогена представляет серьёзную угрозу для здоровья населения. Традиционным местом обитания вибрионов являются поверхностные водоёмы стран с жарким климатом. Недавно у нетоксигенных штаммов холерного вибрионов O1 и не O1/неO139 серогрупп, циркулирующих на территории Российской Федерации (РФ), обнаружено присутствие гена холодового шока *csh1*. Водная экосистема представляет сложный гидробиоценотический комплекс, включающий фито- и зоопланктон. Основным компонентом зоопланктона выступает хитин. В лабораторных условиях нами предпринята попытка создать водный микрокосм (МК). Возможность сохранения и персистенции холерных вибрионов в биоплёнках рассмотрена нами ранее в условиях поэтапного снижения температуры, характерной для водоёмов РФ, однако проблема до конца не исследована.

Цель работы — определение возможности сохранения холерных вибрионов различной токсигенности при низких температурах в условиях микрокосма.

Задачи: получение биоплёнок холерных вибрионов и моделирование микрокосмов для продолжительного эксперимента в изменяющихся условиях.

Материалы и методы. Экспериментальные микрокосмы готовили на автоклавированной речной воде с добавлением одноклеточных зелёных водорослей

Desmodesmus communis (10^4 кл./мл) и биотического субстрата — хитина речного рака *Astacus astacus*. Контрольные пробы не содержали субстрат и микроводоросли.

Пробы на первом этапе инкубации выдерживали при заданной температуре и дневном освещении. Начиная со второго этапа был использован режим освещённости день/ночь. Инкубацию в течение третьего-пятого этапов проводили без освещения (имитация зимних условий). Начиная с шестого этапа освещение проб проводили в режиме день/ночь. Пробы выдерживали поэтапно при разных температурах и освещённости: 25°C ($23\pm 2^\circ\text{C}$); 15°C ($13\pm 2^\circ\text{C}$); 10°C ($8\pm 2^\circ\text{C}$) при освещении день/ночь; 5°C ($6\pm 2^\circ\text{C}$) без освещения.

Для моделирования микрокосмов и контрольных проб использовали два штамма: *V. cholerae* O1 El Tor 19667 *ctxAB+tcpA+csh10-* и 19670 *ctxA-tcpA-csh1+* в исходной концентрации 10^4 кл./мл. По завершении каждого этапа инкубации, производилось извлечение образцов микрокосма и выделение ДНК. Количество клеток каждого штамма определяли, используя ПЦР-РВ с набором праймер-зонд для выявления генов *ctxAB* и *csh1*. Результат выражали в виде десятичного логарифма числа клеток. Параллельно, наличие жизнеспособных клеток холерных вибрионов, подтверждали путём посева на плотные питательные среды.

Результаты. Результаты исследования представлены в таблице.

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ИНКУБАЦИИ МИКРОКОСМА НА КЛЕТКИ *V. CHOLERAЕ* O1 EL TOR 19667 *CTXAB+TCPA+CSH1-* И 19670 *CTXA-TCPA-CSH1+* ПО ДАННЫМ ПЦР-РВ.

Этап инкубации	Время инкубации	Температура инкубации °C	19670		19667	
			МК	Контроль	МК	Контроль
1	1 мес.	25	7,72	6,96	8,04	6,87
2	1 мес.	15	7,46	5,43	8,04	5,63
3	10 дней	10	8,08	5,90	8,48	0,00
4	1 мес.	5	6,58	0,00	6,39	0,00
5	2 мес.	5	7,63	2,04	7,53	0,00
6	4 мес.	15	7,72	0,00	8,00	0,00

7	4 мес.	15	7,74	0,00	8,00	0,00
8	2 мес.	15	7,08	0,00	7,30	0,00

В контрольных пробах (речная вода без субстрата) токсигенный штамм *V. cholerae* O1 El Tor 19667 перестал выявляться в ПЦР-РВ и в высевах по окончании второго периода инкубации (два месяца). Нетоксигенный штамм *V. cholerae* O1 El Tor 19670 с геном холодового шока *csh1* был более устойчивым и сохранился до окончания третьего этапа инкубации при 10°C. Начиная с этого периода, жизнеспособные вибрионы обоих штаммов в контрольных пробах отсутствовали.

В случае микрокосмов, содержащих водоросли и хитин, оба штамма сохранялись на протяжении всего пе-

риода инкубации, увеличив свою концентрацию на три порядка по сравнению с исходной. Жизнеспособность вибрионов обоих штаммов была подтверждена бактериологически. Общее время инкубации проб составило свыше одного года.

Заключение. Таким образом, наличие в микрокосмах хитинового субстрата и клеток водорослей способствует сохранению токсигенных и нетоксигенных холерных вибрионов в жизнеспособном состоянии на срок более одного года при температурах, имитирующих условия поверхностных водоёмов РФ.

Раздел 7. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИЙ ОРГАНОВ РЕПРОДУКЦИИ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ, КУЛЬТУРАЛЬНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Бадиков В.Д., Борухович Д.Г., Захарова О.Г., Борухович Л.С.

СПб ГБУЗ КВД № 11, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Для диагностики урогенитальных инфекций (УГИ) в качестве клинических образцов нередко используют эякулят пациентов, что обусловлено относительной простотой его получения. На сегодняшний день для оценки количественного и качественного состава выявленных в эякуляте микроорганизмов чаще всего используют микроскопический, культуральный и молекулярно-диагностический (ПЦР в режиме реального времени, ПЦР-РВ — тест «Андрофор») методы. Вместе с тем, в доступной литературе очень мало сведений о сопоставимости этих методов исследования при диагностике инфекций половой сферы.

Цель исследования — провести сравнительный анализ результатов лабораторной диагностики УГИ с использованием микроскопического, количественного культурального метода и количественной ПЦР (ПЦР-РВ, тест «Андрофор скрин»).

Материалы и методы исследования. Проведено комплексное микробиологическое исследование эякулята 52 пациентов с подозрением на урогенитальную инфекцию. Возраст пациентов варьировал от 18 до 48 лет (средний возраст составил $32 \pm 5,7$ лет). Пациенты получали эякулят путем мастурбации после тщательного туалета половых органов. Транспортировку проб эякулята проводили в термомоконтейнере в течение не более 4 ч с момента сбора образца. Микробиологическое исследование включало в себя микроскопию окрашенных (по Граму и метиленовым синим) мазков, культуральное исследование (посев на питательные среды) и молекулярно-генетическое исследование. Количественный посев материала осуществляли на пять питательных сред (кровяной агар, желточно-солевой агар, среду МакКонки, Candida Chromogenic Agar и Urinary Tract Infection Chromogenic Agar), а идентификацию выделенных микроорганизмов проводили в соответствии с действующими нормативными документами. Молекулярно-генетическое исследование проводили с использованием набора «Андрофор скрин («ДНК-технология», Россия). Сопоставление результатов исследования проводили только по условно-патогенным микроорганизмам (стафило-, стрепто- и энтерококки, коринебактерии, энтеробактерии, лактобактерии и грибы рода *Candida*).

Основные результаты. Анализ полученных результатов показал, что чувствительность микроскопического метода диагностики при исследовании эякулята составила 10^5 КОЕ/мл. Чувствительность количественных культураль-

ного и молекулярно-генетического методов оказалась сопоставимой и составила 10^3 КОЕ/мл. Результаты ПЦР-РВ и культурального методов (количественный и качественный состав возбудителей инфекции) практически полностью совпали в $63,5 \pm 3,6$ % случаев. При этом у 8 ($15,4 \pm 1,9$ %) пациентов при культуральном и молекулярно-генетическом исследовании микроорганизмы не были обнаружены, а у оставшихся 25 ($48,1 \pm 3,2$ %) выявленная микробиота была представлена корине-бактериями, а также стафило- и стрептококками в относительно низкой концентрации (10^3 — 10^4 КОЕ/мл). Такой результат было достаточно сложно интерпретировать, поскольку количественный и качественный их состав совпадал с микробиотой дистального отдела уретры и мог свидетельствовать о контаминации эякулята при его получении пациентом.

При микроскопическом исследовании 52 пациентов микроорганизмы в мазках обнаружены у 19 ($36,5 \pm 2,8$ %). Особенность микроскопического метода исследования заключалась в том, что все обнаруженные с помощью данного метода микроорганизмы практически всегда, в силу аналитической чувствительности этого метода (10^5 КОЕ/мл), относились к категории этиологически значимых (грамположительные кокки, коринеформные бактерии, грамотрицательные палочки). К исключениям из этого правила можно отнести только микроорганизмы рода *Lactobacillus*, которые в ряде случаев попадали в эякулят при прохождении спермы через дистальный отдел уретры, контаминированный в результате половых контактов. Эти бактерии отличаются слабой патогенностью и в большинстве случаев не способны вызвать УГИ.

К достоинствам микроскопического метода, помимо простоты, скорости и невысокой стоимости исследования, следует отнести и возможность оценить лабораторные признаки воспаления (более 3-5 полиморфноядерных лейкоцитов в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 1000$), недоступные для культурального и молекулярно-генетического методов. Умеренная лейкоцитоспермия (6-10 лейкоцитов в поле зрения, $\times 1000$) была отмечена у 40,4 % пациентов.

Результаты культурального и молекулярно-генетического методов не совпадали у 19 пациентов ($36,5 \pm 2,8$ % обследованных). При этом при исследовании эякулята методом ПЦР-РВ чаще всего обнаруживали стафило- и стрептококки ($34,6 \pm 2,7$ %) и коринебактерии ($28,8 \pm 2,3$ %), а при культуральном исследовании — энтерококки ($21,2 \pm 2,1$ %)

и энтеробактерии (9,6±1,6%), представленные *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* и *Proteus mirabilis*. Культуральный и молекулярно-генетический методы взаимодополняли друг друга, что требует одновременного их назначения при диагностике УГИ.

К достоинствам ПЦР-РВ (тест «Андрофлор скрин») следует отнести быстрое получение результатов исследования и широкий спектр выявляемых условно-патогенных микроорганизмов (стафило-, стрепто- и энтерококки, энтеробактерии, кандиды, коринеформные бактерии), однако их микробный состав более, чем в трети случаев (36,5±2,8% обследованных), не совпадал с результатами культурального метода исследования. К несомненным достоинствам культурального метода следует отнести более точную идентификацию выделенных микроорганизмов и возможность определять чувствительность возбудителей к анти-микробным препаратам. Недостатки этого метода заключаются в трудоёмкости и длительности исследования.

Выводы.

1. Для диагностики УГИ рекомендуется использовать одновременно все три метода (микроскопический, культуральный и молекулярно-генетический). Это обусловлено тем, что каждый из этих методов обладает своими достоинствами и недостатками, а для постановки обоснованно-

го диагноза инфекций половой сферы необходимо анализировать весь комплекс полученных данных.

2. Для выявления условно-патогенных возбудителей УГИ и назначения рациональной антимикробной терапии предпочтение, по нашему мнению, необходимо отдавать количественному культуральному методу диагностики, а ПЦР-РВ (тест «Андрофлор скрин») и микроскопическое исследование эякулята следует рассматривать как дополнение к методу культивирования микроорганизмов, расширяющих и уточняющих его результаты.

3. Обнаружение в эякуляте условно-патогенных микроорганизмов в концентрации 10^3 — 10^4 КОЕ/мл не позволяет сделать однозначный вывод об их принадлежности к возбудителям УГИ и требует проведения повторных лабораторных исследований семенной жидкости с интервалом 10-15 дней.

4. Разработчикам теста «Андрофлор скрин» («ДНК-технология», Россия) рекомендуется обратить внимание на опцию *Enterobacteriaceae spp./Enterococcus spp.* Рекомендация связана с тем, что из 18 культуральных исследований, в которых обнаруживали энтерококки, энтеробактерии или их сочетания в высоких концентрациях (10^5 — 10^7 КОЕ/мл), совпадения результатов с тестом «Андрофлор скрин» получили только у 4 пациентов (22,2±2,2%).

ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДНК-НАНОСЕНСОРОВ И ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИППП

Горбенко Д.А., Рубель М.С., Филатов П.В., Афанасьева А.А., Дададжанов Д.Р.

Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Быстрая диагностика инфекций, передающихся половым путем (ИППП), вызываемых такими патогенами, как *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* или *Mycoplasma genitalium* имеет важное практическое значение в области дерматовенерологии. Эти ИППП требуют своевременного вмешательства для эффективного лечения и профилактики осложнений. Возможность детекции патогенов в течение приема врача (~30 минут) стала бы большим шагом к улучшению текущей ситуации в эпидемиологическом контроле ИППП.

Существует множество способов диагностики патогенов, передающихся половым путем, таких как иммуноферментный анализ или полимеразная цепная реакция в реальном времени. В большинстве случаев вышеперечисленные методы либо сложные для выполнения в кабинете врача, либо требуют дорогостоящего оборудования, такого как амплификатор для ПЦР. Тем не менее, именно анализ нуклеиновых кислот — базовый принцип чувствительной диагностики патогенных инфекций. На сегодняшний момент необходимы РОСТ (point-of-care testing) системы, которые могут быть доступны в условиях отсутствия обученного персонала и специального оборудования. Ввиду этого использование новых концепций, например ДНК-наносенсоров, может быть разумным решением.

Задачами этой работы было создание системы ДНК-наносенсоров для детекции *N.gonorrhoea*, выбора наилучшей системы визуализации и определения возможности использования их в диагностике, подходящим под принципы РОСТ.

Материалы и методы. В представленной работе бинарный гибридационный ДНК-наносенсор был использован для обнаружения фрагмента 16S рРНК *N.gonorrhoea* (аналит). Благодаря структуре стержневой петли, гибридационный зонд имеет повышенную селективность, которую обеспечивает «длинное» аналит-связывающее плечо и способен распознавать даже однонуклеотидные замены (обеспечивается «коротким», нарушающим формирование комплекса, плечом). В основе ДНК-наносенсора лежит конструкция типа 4-way junction (4WJ), состоящая из двух цепей ДНК и универсального гибридационного зонда с серебряной плазмонной наночастицей (AgNPs), конъюгированной на 5'-конце (UMB_NP) [1]. Обе последовательности ДНК состоят из двух частей — комплементарной исследуемому фрагменту и комплементарной фрагменту UMB_NP. При добавлении аналита формируется надмолекулярный комплекс, стягивающий AgNPs наночастицы на поверхность стрептавидиновой матрицы, также присутствующей в растворе и шитой с «коротким» аналит-связывающим плечом

ДНК-наносенсора. Реакцию проводили в присутствии 50 мМ $MgCl_2$, 50 мМ Tris HCl при комнатной температуре.

Существует несколько типов тест-систем на основе регистрации хемилюминесценции (ХЛ), в которых используются различные хемилуцинофоры для определения присутствия целевой последовательности РНК или ДНК, такие как люминол. В этом исследовании мы представляем метод обнаружения патогенов, основанный на регистрации ХЛ сигнала люминола в канале микрофлюидного проточного чипа. В присутствии аналита происходит агрегация плазмонных AgNPs, что физически усиливает ХЛ люминола. Данная реакция может быть зарегистрирована с помощью высокоточного счетчика фотонов (Hamamatsu, H11890).

Результаты. Реакция детекции таргетной последовательности *N.gonorrhoea* проводится в течение нескольких минут после начала агрегации. Ожидаемая чувствительность данной системы составляет десятки геномных эквивалентов. Кроме того, было показано, что AgNPs могут быть агрегированы на поверхности стрептавидина при

добавлении аналита в концентрациях, близких к микромолярным. Такое скопление AgNPs легко обнаруживалось невооруженным глазом в канале микрофлюидного чипа. Кроме того, анализ динамического рассеяния света (DLS) показал существенный сдвиг в диапазоне размеров образовавшихся комплексов, что в перспективе может быть применено для более точного количественного определения аналита.

Заключение. Результаты демонстрируют потенциал предложенной молекулярной и оптической систем для визуального, быстрого и недорогого обнаружения патогенов, вызывающих ИППП. Ожидается формирование решения, готового к применению в кабинете врача, а также расширение списка анализов.

Авторы исследования благодарны Министерству образования и науки Российской Федерации № FSER-2022-0009 и программе «Приоритет 2030» за финансовую поддержку.

1. Kolpashchikov, D. M. A binary DNA probe for highly specific nucleic acid recognition. *JACS*. 2006; 128(32):10625-10628.

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ГИДРОГЕЛЕВЫЕ БИОЧИПЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ УСТОЙЧИВОСТИ *NEISSERIA GONORRHOEA* К АКТУАЛЬНЫМ АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Кандинов И.Д.¹, Кравцов Д.В.¹, Дементьева Е.И.¹, Кубанов А.А.², Соломка В.С.², Шагабиева Ю.З.², Дерябин Д.Г.², Филиппова М.А.¹, Шаскольский Б.Л.¹, Грядунов Д.А.¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия

² Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии Минздрава России (ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России), Москва, Россия

Введение. Гонококковая инфекция, вызываемая грамотрицательной бактерией *Neisseria gonorrhoeae*, является одной из наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путем (ИППП). Актуальность гонореи для общественного здравоохранения определяется такими аспектами, как сохраняющийся высокий уровень заболеваемости, преимущественное распространение среди лиц репродуктивного возраста с выраженным негативным влиянием на фертильность, повышенный риск коинфекции другими ИППП, отсутствие гонококковой вакцины и прогрессирующая устойчивость *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам. В настоящее время в большинстве стран мира в качестве комбинированной антимикробной терапии для лечения гонореи используются цефалоспорины третьего поколения (цефтриаксон) вместе с азитромицином. В настоящее время изоляты *N. gonorrhoeae*, устойчивые к цефтриаксону, выявлены во многих странах мира, при этом количество резистентных к азитромицину штаммов увеличивается с каждым годом. В некоторых европейских и азиатских странах доля устойчивых к азитромицину изолятов превышает 5%, что является пороговым значением для исключения этого препарата из схем терапии согласно рекомендациям ВОЗ. Контроль за распространением вариантов гонококка, устойчивого к современным

противомикробным препаратам, является актуальной задачей, подтвержденной глобальной и региональными программами мониторинга антибиотикорезистентности.

Цель/задачи. Разработка эффективных методов идентификации генетических детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к цефтриаксону и азитромицину и выявление таких маркеров в современной российской популяции изолятов возбудителя гонореи.

Материалы и методы. Исследовано 448 клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, полученных в период с 2018 по 2021 г. из 17 субъектов Российской Федерации. Первичный сбор клинического материала проводили в специализированных учреждениях дерматовенерологического профиля, последующую фенотипическую характеристику выполняли в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России.

Для разработки метода анализа генетических детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к антибиотикам использовали технологию гидрогелевых биочипов ИМБ РАН. Биочип для выявления изолятов со сниженной чувствительностью к цефтриаксону обеспечивал идентификацию 37 мутаций в генах *penA* (кодирует пенициллинсвязывающий белок 2), *ropA* (кодирует пенициллинсвязывающий белок 1) и *porB* (кодирует белок поринового канала), включая мутации как в мозаичных, так и в немозаичных аллелях.

лях гена *penA*. Биочип для анализа азитромицин-устойчивых изолятов содержал олигонуклеотидные зонды для идентификации мутаций в гене 23S рРНК (позиция 2611), в гене *mtrR* (кодоны 39, 45, 86 и 105), гене *mtrD* (кодоны 821 и 823), а также в промоторной области гена *mtrR* (позиции –10 и –35), включая мозаичные и немозаичные аллели генов *mtrR* и *mtrD*. Конструирование зондов для выявления мутации в гене 23S рРНК проводилось с учетом всех четырех копий оперона *rrn*, что позволяло регистрировать наличие или отсутствие мутаций в каждой отдельной копии гена 23S рРНК. Процедура анализа включала мультиплексную амплификацию и одновременное флуоресцентное маркирование фрагментов указанных выше генов с последующей гибридизацией полученных продуктов на биочипе, регистрацией и интерпретацией результатов с использованием универсального аппаратно-программного комплекса для анализа биочипов (ИМБ РАН, Россия).

Результаты. Разработан метод предсказания уровня устойчивости *N. gonorrhoeae* к цефтриаксону посредством идентификации мутаций в геноме изолята на специализированном олигонуклеотидном биочипе и последующего расчета значения минимальной подавляющей концентрации (МПК) согласно регрессионному уравнению:

$$\log_2 \text{МПК}_{\text{цеф}} = -8,993 + 3,340 \times (\text{Ala}311 \rightarrow \text{Val})_{\text{penA}} + 1,268 \times (\text{Ile}312 \rightarrow \text{Met})_{\text{penA}} + 0,001 \times (\text{Val}316 \rightarrow \text{Thr})_{\text{penA}} + 0,001 \times (\text{Val}316 \rightarrow \text{Pro})_{\text{penA}} + 1,386 \times (\text{insAsp}(345-346))_{\text{penA}} + 0,001 \times (\text{Thr}483 \rightarrow \text{Ser})_{\text{penA}} + 1,312 \times (\text{Ala}501 \rightarrow \text{Val})_{\text{penA}} + 0,717 \times (\text{Ala}501 \rightarrow \text{Thr})_{\text{penA}} + 5,203 \times (\text{Ala}501 \rightarrow \text{Pro})_{\text{penA}} + 0,711 \times (\text{Asn}512 \rightarrow \text{Tyr})_{\text{penA}} + 1,277 \times (\text{Gly}542 \rightarrow \text{Ser})_{\text{penA}} + 1,468 \times (\text{Gly}545 \rightarrow \text{Ser})_{\text{penA}} + 0,757 \times (\text{Pro}551 \rightarrow \text{Leu})_{\text{penA}} + 1,033 \times (\text{Pro}551 \rightarrow \text{Ser})_{\text{penA}} + 0,095 \times (\text{Leu}421 \rightarrow \text{Pro})_{\text{porB}} + 0,638 \times (\text{Gly}120 \rightarrow \text{Asn})_{\text{porB}} + 0,521 \times (\text{Gly}120 \rightarrow \text{Asp})_{\text{porB}} + 1,248 \times (\text{Gly}120 \rightarrow \text{Lys})_{\text{porB}} + 2,466 \times (\text{Gly}120 \rightarrow \text{Arg})_{\text{porB}} + 0,227 \times (\text{Ala}121 \rightarrow \text{Ser})_{\text{porB}} + 0,001 \times (\text{Ala}121 \rightarrow \text{Asn})_{\text{porB}} - 0,313 \times (\text{Ala}121 \rightarrow \text{Gly})_{\text{porB}} - 0,137 \times (\text{Ala}121 \rightarrow \text{Asp})_{\text{porB}}$$

Полученная регрессионная модель была обучена с использованием характеристик 5812 изолятов *N. gonorrhoeae* со всего мира. Валидация метода, проведенная с использо-

ванием 448 российских изолятов, показала, что для 94,4% штаммов предсказанное значение МПК к цефтриаксону отличалось не более чем на один шаг от экспериментально определяемых концентраций. В исследуемой выборке российских изолятов 2018–2021 года устойчивые к цефтриаксону (МПК_{цеф} > 0,125 мг/л) штаммы отсутствовали.

Несмотря на то, что азитромицин не рекомендован в России для лечения гонококковой инфекции, нами был зарегистрирован рост резистентности (МПК_{казм} > 1,0 мг/л) *N. gonorrhoeae* к этому препарату: 16,8% (17 из 101) в 2020 году и 9,3% (5 из 54) штаммов в 2021 году, при этом все изоляты, полученные в 2018 и 2019 г., были фенотипически чувствительны. Большинство устойчивых к азитромицину изолятов характеризовались наличием мозаичной структуры промоторной области гена *mtrR* с делецией -35delA, мутацией Ala86Thr в гене *mtrR*, а также мозаичной структурой гена *mtrD*. Филогенетический анализ современной российской популяции гонококка выявил отдельный кластер азитромицин-устойчивых изолятов, относящийся к генотипу G12302, широко распространенной в европейской популяции, при этом данный кластер оказался филогенетически отдаленным от эндемичных российских изолятов. Таким образом, причиной возникновения в России нового варианта возбудителя гонококковой инфекции, устойчивого к макролидам, является трансграничный перенос резистентного штамма со специфическими генетическими детерминантами.

Заключение/выводы. Разработанные методы анализа детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к цефтриаксону и азитромицину являются надежным инструментом мониторинга антибиотикорезистентности возбудителя гонококковой инфекции. Метод предсказания уровня устойчивости *N. gonorrhoeae* к цефтриаксону стал основой для создания набора реагентов «NG-ТЕСТ», настоящее время проходящего регистрацию как медицинское изделие в Росздравнадзоре. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1660).

ОСОБЕННОСТИ ВИДОВОГО СОСТАВА ЛАКТОБАЦИЛЛ В ОТДЕЛЯЕМОМ ВЛАГАЛИЩЕ У ПАЦИЕНТОК С ЦЕРВИКАЛЬНЫМИ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ

Костюк С.А.¹, Пинчук Т.В.², Полуян О.С.¹, Можейко Л.Ф.², Лямцева А.К.¹

¹ Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (ГУО «БелМАПО»), Минск, Республика Беларусь.

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет» (УО «БГМУ»), Минск, Республика Беларусь.

Введение. Одним из широко распространенных патологических процессов шейки матки являются ее предраковые состояния — цервикальные интраэпителиальные поражения (squamous intraepithelial lesion, SIL). Ведущая роль в развитии данного заболевания принадлежит вирусу папилломы человека высокого канцерогенного риска, длительная персистенция которого приводит к клеточным

изменениям, характерным для предрака и рака шейки матки. Взаимосвязь между дефицитом лактобактерий во влагалище и цервицитом является предметом научных исследований, результаты которых позволяют предположить, что отсутствие лактобактерий, продуцирующих перекись водорода, влияют на иммунный ответ и способствуют клеточной регенерации, что может способствовать развитию цер-

вицита. В настоящее время не установлено достоверных маркеров, позволяющих проводить оценку предрасположенности конкретного пациента к развитию цервикальных интраэпителиальных поражений, прогнозировать вариант течения и исход заболевания. Одним из перспективных направлений в поиске маркеров прогноза заболевания является идентификация видового состава *Lactobacillus spp.*

Цель исследования. Изучение видового разнообразия *Lactobacillus spp.* у женщин с цервикальными интраэпителиальными поражениями и установление его особенностей.

Материалы и методы. Научные исследования проводились на базе кафедры акушерства и гинекологии УО «БГМУ» и группы ПЦР-диагностики Научно-исследовательской лаборатории ГУО «БелМАПО» с применением авторской методики ПЦР для дифференциальной диагностики различных видов лактобацилл и тест-системы «АмплиПрайм Флороценоз» (РФ). Биологическим материалом для исследований явились образцы отделяемого из влагалища пациентов с цервикальными интраэпителиальными поражениями низкой степени (n=12) — группа 1, хроническим цервицитом, вызванным бактериями, ассоциированными с бактериальным вагинозом (n=12) — группа 2. Контрольную группу составили 12 гинекологически здоровых пациенток.

Выделение ДНК из биологического материала проводили с использованием набора реагентов «Арт-ДНК MiniSpin» («АртБиоТех», РБ). Нами были подобраны соответствующие видоспецифические праймеры для определения основных видов лактобацилл, которые присутствуют в вагинальном биотопе — *Lactobacillus crispatus* (LcrisF: 5'-AGCGAGCGGAACATAACAGATTTC-3'; LcrisR: 5'-AGCTGATCATGCGATCTGCTT-3'); *Lactobacillus iners* (InersF: 5'-GTCTGCCTTGAAGATCGG-3, InersR: 5'-ACAGTTGATAGGCATCATC-3'); *Lactobacillus jensenii* (LjensF: 5'-AAGTCGAGCGAGCTTGCCTATAGA-3'; LjensR: 5'-CTTCTTTTCATGCGAAAGTAGC-3'); *Lactobacillus gasseri* (LgassF: 5'-AGCGAGCTTGCCTAGATGAATTTG-3, LgassR: 5'-TC TTTAAACTCTAGACATGCGTC-3'); *Lactobacillus vaginalis* (LV16s_23s_F: 5'-GCCTAACCATTTGGAGGG-3; LV16s_23s_R3:543GATGTGTAGGTTCCG-3'). Состав амплификационной смеси: 5 мкл выделенной ДНК, 5 мкл соответствующих праймеров, 10 мкл SYBR Green PCR, 10 мкл депротеинизированной воды. Программа амплификации для *Lactobacillus crispatus*: 95°C 15 минут, 40 циклов: 95°C 15 с, 60°C 60с, 72°C 20 с; для *Lactobacillus iners*: 95°C 15 мин, 35 циклов: 95°C 15 с, 60°C 55 с, 72°C 60 с; для *Lactobacillus jensenii*: 95°C 15 мин, 40 циклов: 95°C 15 с, 60°C 55 с, 72°C 60 с; для *Lactobacillus gasseri*: 95°C 15 мин, 40 циклов: 95°C 15 с, 57°C 60с, 65°C 60 с; для *Lactobacillus vaginalis*: 95°C 15 мин, 37 циклов: 95°C 15 с, 56°C 30с, 72°C 30 с.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи программы «STATISTICA 8.0». При уровне значимости $p < 0,05$ различия считались статистически достоверными. Для описания частот выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения.

Результаты. Общая бактериальная масса находилась в пределах нормы в группе практически здоровых женщин и у пациенток с хроническим цервицитом — 8,9 (8,33/11,03) и 11,75 (11,25/12,9) Ig соответственно. В группе женщин с цервикальными интраэпителиальными поражениями низ-

кой степени общая микробная масса была выше — 15,5 (13,0/17,2) Ig. При этом статистически достоверные различия по данному показателю определены для контрольной группы и группы женщин с цервикальными интраэпителиальными поражениями низкой степени ($p < 0,05$); для контрольной группы женщин и группы женщин с хроническим цервицитом, а также группы 1 и группы 2 статистически достоверные различия не выявлены ($p > 0,05$). Концентрация всех анаэробных микроорганизмов была существенно выше в отделяемом влагалища женщин в группе 1 по сравнению с женщинами группы 2 и контрольной группы. В группе 1 преобладали более высокие концентрации *Gardnerella vaginalis*. (>105 ГЭ/мл) и *Atopobium vaginae* (>105 ГЭ/мл) по сравнению со значениями, полученными в группе 2 женщин и в контрольной группе ($p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о значительных колебаниях в количественном содержании *Lactobacillus spp.* в группе 1 и 2 женщин с хроническим цервицитом по сравнению с контрольной группой: 6,45 (5,5/7,5); 8,0 (7,9/9,75) и 10,2 (8,8/10,95) Ig соответственно, что может рассматриваться как неблагоприятный фоновый показатель биоценоза влагалища у женщин при хроническом цервиците и цервикальных интраэпителиальных поражениях низкой степени. В группе практически здоровых женщин ДНК *Lactobacillus crispatus* выявлялись в 58,3% случаев, ДНК *Lactobacillus vaginalis* — в 33,3% случаев, ДНК *Lactobacillus jensenii* — в 16,6% случаев, *Lactobacillus gasseri* — в 8,3% случаев. При исследовании видового состава лактобацилл в отделяемом влагалища женщин с хроническим цервицитом выявлен дефицит *Lactobacillus crispatus* (8,3%) и преобладание ДНК *Lactobacillus jensenii* (50%), ДНК *Lactobacillus vaginalis* (33,3%) и *Lactobacillus gasseri* (16,6%). В 1 группе женщин определялись преимущественно лактобациллы одного вида — *Lactobacillus iners*, они были обнаружены у 19 (65,5%) женщин. В группе гинекологически здоровых женщин ДНК *Lactobacillus iners* выявлялись в 75,0% случаев, *Lactobacillus jensenii* — в 16,6%, *Lactobacillus vaginalis* — в 8,3%, *Lactobacillus gasseri* — в 8,3% случаев.

Выводы. У пациенток цервикальными интраэпителиальными поражениями установлено значительное снижение содержания *Lactobacillus spp.* в отделяемом влагалища в сочетании с увеличением общей бактериальной массы и количества анаэробных микроорганизмов. Определено, что у гинекологически здоровых женщин при физиологическом микробиоценозе влагалища в биотопе определяется в ассоциациях многообразие ДНК лактобацилл (3-4 вида) с превалированием ДНК видов *Lactobacillus crispatus* и ДНК *Lactobacillus vaginalis*. При хроническом цервиците биоценоз влагалища характеризуется менее выраженным разнообразием видов лактобактерий (2-3 вида) с доминированием в данном биотопе ДНК *Lactobacillus jensenii*, тогда как во влагалище женщин с цервикальными интраэпителиальными поражениями выявляется преимущественно ДНК вида *Lactobacillus iners*. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о доминирующем виде лактобацилл у женщин с цервикальными интраэпителиальными поражениями — *Lactobacillus iners*, который возможно характерен преимущественно для данной группы пациенток.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НИЖНИХ ОТДЕЛОВ МОЧЕПОЛОВОГО ТРАКТА У МУЖЧИН МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Болотина Е.С., Яковлев И.М., Антипин Д.А., Дюкина Т.В., Шуйтасова Л.М.

ГБУЗ «Областной кожно-венерологический диспансер № 4», Магнитогорск, Россия

Введение. Инфекционно-воспалительные заболевания мочеполовой системы (МПС) у мужчин являются одной из причин нарушения репродуктивной функции и снижения качества жизни, что имеет огромное социально-экономическое значение. Повреждение тканей в ходе инфекционно-воспалительного процесса может происходить в результате прямого действия микроорганизмов и опосредованного, вследствие неадекватной воспалительной реакции в ответ на инфицирование патогенными микроорганизмами, увеличением количества условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) или размножением эндогенных условно-патогенных микроорганизмов.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) является прямым методом лабораторной диагностики и регламентирован «Федеральными клиническими рекомендациями по дерматологии и косметологии 2020-2023» (ФГБУ ГН ЦДК) по ведению больных с инфекциями, передаваемыми половым путём, и урогенитальными инфекциями, Приказом МЗ РФ от 29 декабря 2012 года N 1675н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при неспецифическом и другом уретрите», Приказом МЗ РФ от 29 декабря 2012 года N 1751н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при неуточненном уретральном синдроме», Приказом МЗ РФ от 29 декабря 2012 г. N 1684н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при фимозе, баланопостите, баланите, язве и лейкоплакии полового члена и других воспалительных заболеваний полового члена».

Цель и задачи. Количественная оценка урогенитального микробиома у мужчин, выявление ДНК патогенных микроорганизмов, количественная оценка грибов рода *Candida* и ограниченного спектра УПМ с целью этиологической диагностики воспалительных заболеваний нижних отделов мочеполового тракта у мужчин.

Материалы, методы. Учитывая организационные условия и материальную базу лаборатории, доступную стоимость для пациентов был выбран набор в комплектации «Андрофлор@Скрин» производитель НПФ «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ». Материал для исследования: отделяемое уретры у мужчин. Оборудование: миницентрифуга-вортекс «Микроспин FV-2400», термостат твердотельный «Термит», центрифуга «Миниспин», бокс лабораторный с УФ-лампой, амплификатор детектирующий «ДТ лайт» с программным обеспечением. Пробоподготовка выполнялась комплектом реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК сорб АМ» ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии».

Результаты. В 2021 — 2022 г.г. в лаборатории ГБУЗ «ОКВД № 4» было обследовано 376 мужчин. Показания: наличие жалоб и/или клинически объективные симптомы воспаления нижних отделов мочеполовой системы.

ДНК патогенных микроорганизмов выявлена у 30 пациентов, из них:

— ДНК *Chlamydia trachomatis* выявлена у 21 пациента, что составляет 5,58%,

— ДНК *Neisseria gonorrhoeae* выявлена у 2 пациентов, что составляет 0,53%,

— ДНК *Trichomonas vaginalis* выявлена у 5 пациентов, что составляет 1,33%,

— ДНК *Mycoplasma genitalium* выявлена у 7 пациентов, что составляет 1,86%.

Из них микст-инфекция выявлена в 5 случаях, что составляет 16,6%:

— ДНК *Chlamydia trachomatis* + *Neisseria gonorrhoeae* — 1 пациент,

— ДНК *Chlamydia trachomatis* + *Trichomonas vaginalis* — 1 пациент,

— ДНК *Chlamydia trachomatis* + *Mycoplasma genitalium* — 3 пациента.

ДНК патогенных микроорганизмов не выявлены у 346 пациентов, из них:

— снижение/отсутствие нормальной микрофлоры — у 117 пациентов, что составляет 31,1%,

— превышение пороговых значений транзитной микрофлоры — у 43 пациентов,

— обнаружение ДНК дрожжевых грибов рода *Candida* — у 16 пациентов, что составляет 4,25% (клинически значимое пороговое значение — 104),

— превышение в структуре бактериального микробиома УПМ (*Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*) — у 63 пациентов, что составляет 16,75%.

Выводы.

1. Метод ПЦР с регистрацией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ), позволяет проводить количественную оценку микробиома, включая плохо- и некультивируемые облигатно-анаэробные микроорганизмы, не прибегая к трудоёмким микробиологическим методам. Он гораздо более чувствителен, чем культуральный метод. Однако он не позволяет определить чувствительность микроорганизмов к антибиотикам и не исключает проведение комплексного лабораторного обследования пациентов. Метод ПЦР-РВ хорошо применять для первичного скрининга.

2. У 107 обследованных пациентов, что составляет 28,5%, не определена этиологическая причина инфекционно-воспалительного процесса в связи с ограниченными возможностями используемого набора. Эти пациенты требуют дополнительного обследования с расширением спектра определяемых микроорганизмов и отбором материала для исследования (секрет предстательной железы или эякулят).

3. Среди выявленных причин инфекционно-воспалительных заболеваний мочеполовой системы у обследуемого контингента мужчин преобладает условно-патогенная флора (16,75%). Количественный анализ её содержания, безусловно, увеличивает диагностическую эффективность метода ПЦР-РВ.

4. Превышение пороговых значений транзитной микрофлоры зарегистрировано в 11,4% случаев. При диагностике острых заболеваний нижних отделов МПС наличие транзитной микрофлоры может служить косвенным маркером причины заболевания, при диагности-

ке хронических заболеваний служит маркером качества подготовки пациента к проведению исследования. Для получения достоверных результатов лабораторных исследований и исключения наличия транзитной флоры в урогенитальном тракте мужчин, попадающей от гетеросексуального партнера, необходимо соблюдение ряда требований, одним из которых является получение клинического материала из уретры не ранее, чем через 3 часа после последнего мочеиспускания, при наличии обильных уретральных выделений — через 15-20 минут после мочеиспускания.

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К МАКРОЛИДАМ И ФТОРХИНОЛОНАМ *Mycoplasma genitalium*, ВЫДЕЛЕННЫХ У БЕРЕМЕННЫХ ТУЛЫ И СМОЛЕНСКА

Авчинникова Д.А.¹, Эйдельштейн И.А.², Покусаева В.Н.¹, Дехнич А.В.², Руднева Н.С.³

¹ Смоленский государственный медицинский университет, Смоленск, Россия

² НИИАХ ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск, Россия

³ ГУЗ Тульский областной клинический кожно-венерологический диспансер, Тула, Россия

Введение. Инфекции, передающиеся половым путем, — глобальное социально-экономическое бремя, ведущее к ряду осложнений, снижающих репродуктивный потенциал пациентки приводящих к неблагоприятным перинатальным исходам. Одним из ключевых облигатных патогенов является *Mycoplasma genitalium* (MG), роль которого в развитии цервицита, воспалительных заболеваний органов малого таза, самопроизвольных абортов, преждевременных родов и бесплодия подтверждается многими авторами [1]. В связи с этим возрастает значение своевременной диагностики и эффективной терапии микоплазменной инфекции. Однако, в последние десять лет накапливаются данные о появлении штаммов MG устойчивых к рекомендованной терапии — макролидам (MP) и фторхинолонам (ФР). Согласно данным мета-анализа Machalek et. al (2020), суммарная частота мутаций, обуславливающих MP возросла с 10 до 51% в период с 2010 до 2016–2017 г, а ФР сохраняется на уровне 8%, в то время как устойчивость к обеим группам выявляется в 3% случаев [2]. В недавних исследованиях из США и ЮАР сообщается о частоте распространенности MG, резистентной к макролидам и фторхинолонам у беременных: в 30,8% случаев выявлялись мутации MP, в 3,8% в генах *gyrA M. genitalium*, а в 5,6% *parC M. genitalium*, отвечающих за ФР [3]. В исследовании из ЮАР в 28,6% случаях отмечалась MP, маркеры резистентности к фторхинолонам не были выявлены [4]. Ввиду отсутствия альтернативных вариантов лечения прогностически неблагоприятно выявление микоплазменной инфекции, не поддающейся традиционной терапии, в когорте беременных. В связи с отсутствием известных нам отечественных исследований, посвященных изучению антибиотикорезистентности MG у беременных, проведение скрининга беременных на MG и изучение частоты выявления мутаций MG, связанных с устойчивостью к макролидам и фторхинолонам приобретает особую актуальность.

Цель и задачи: оценка частоты распространения *M. genitalium*, устойчивых к макролидами фторхинолонам у беременных из Тулы и Смоленска.

Материалы и методы. Изучался материал, полученный от 45 пациенток (средний возраст 26,3 лет (17-40)) с подтвержденной беременностью, с положительным результатом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на MG в период с 2013-2023г. Всем пациенткам проводилось взятие соскоба из цервикального канала для скрининга на MG с использованием коммерческого набора реагентов «АмплиПрайм®NCMT» («НекстБио», Россия) на базе ГУЗ Тульский областной клинический кожно-венерологический диспансер (n=30) и НИИАХ ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России (Смоленск, Россия) (n=15). Полученный материал анализировался в лаборатории молекулярной диагностики НИИАХ для исследования маркеров резистентности к макролидам и фторхинолонам с помощью метода ПЦР в режиме реального времени с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером [5]. Для подтверждения замен в V домене 23S рРНК и в QRDR генов *parC* и *gyrA M. genitalium*, проводилось секвенирование по Сэнгеру с использованием наборов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, CA, USA).

Основные результаты. В результате исследования, маркеров MP не найдено ни в одном образце. В ходе дальнейшего анализа установлено, что в 3 (6,7%) образцах MG, выделенных у беременных из Тулы, выявлены мутации, обуславливающие ФР. Среди идентифицированных мутаций встречались следующие варианты замен: 2-D84N и 1-S80N (нумерация по *E.coli*). Данный результат, вероятно, может быть связан со следующими факторами: предшествовавшей терапией инфекций мочевыводящих путей (ИМП) (цистит, пиелонефрит) фторхинолонами; практикой самолечения препаратами этой группы при ИППП, характеризующихся схожей симптоматикой с ИМП; несоблюдением кратности

и длительности приема антибактериального препарата, а также с заражением MG уже несущей мутацию. Необходимо также отметить, что у 7 (15,5%) беременных выявлено ко-инфицирование СТ, что является неблагоприятным фактором ввиду общности ряда клинических характеристик и возможности выбора антибактериальной терапии.

Заключение. При исследовании клинического материала, полученного от беременных Тулы и Смоленска в период с 2013 по 2023 г, не выявлено MG, устойчивых к макролидам. Принимая во внимание небольшой объем выборки, это может свидетельствовать о сравнительно благополучной ситуации в данных регионах в отношении резистентности MG к макролидам. Однако обнаружение у MG устойчивости к фторхинолонам свидетельствует о необходимости динамического эпидемиологического надзора за устойчивостью к этой группе препаратов в этой популяции пациенток.

Список литературы:

1. Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE. Mycoplasma genitalium infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2015; 61:418–26. PMID:25900174 <https://doi.org/10.1093/cid/civ312>
2. Machalek DA, Tao Y, Shilling H, Jensen JS, Unemo M, Murray G, Chow EPF, Low N, Garland SM, Vodstrcil LA, Fairley

CK, Hocking JS, Zhang L, Bradshaw CS. Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2020 Nov;20(11):1302-1314. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30154-7. Epub 2020 Jul 2. PMID: 32622378.

3. Stafford I.A., Hummel K., Dunn J.J., et al. Retrospective analysis of infection and antimicrobial resistance patterns of *Mycoplasma genitalium* among pregnant women in the southwestern USA. *BMJ Open* 2021;11:e050475. doi:10.1136/bmjopen-2021-050475

4. Le Roux, Marcelle & M, Mafunise & BE, de & RMM, Ditsele. (2017). P1.37 Prevalence and molecular analysis of mycoplasma genitalium strains isolated from pregnant women at an academic hospital in pretoria, south africa. *Sex Transm Infect*. 93. A58.2-A58. 10.1136/sextrans-2017-053264.145.

5. Inna Alexandrovna Edelstein, Andrey Vyacheslavovich Romanov, and Roman Sergeevich Kozlov. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of Macrolide Resistance Mutations in *Mycoplasma genitalium* and Its Application for Epidemiological Surveillance in Russia. *Microbial Drug Resistance*. Mar 2023.69-77. <http://doi.org/10.1089/mdr.2022.0131>

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ФТОРХИНОЛОНАМ В КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТАХ MYCOPLASMA GENITALIUM, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ ГОРОДА МИНСКА РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ ЗА ПЕРИОД С МАРТА ПО НОЯБРЬ 2022 ГОДА

Маджарова О.А.¹, Эйдельштейн И.А.², Абельская И.С.¹, Галицкая С.С.¹, Качанко Е.Ф.¹, Козаченко М.Г.¹, Романов А.В.², Козлов Р.С.²

¹ ГУ «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь.

² НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск, Россия.

Цель: определить спектр и распространенность маркеров резистентности к фторхинолонам у *Mycoplasma genitalium*, выделенных от пациентов, обратившихся за медико-консультативной помощью в ГУ «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь за период с марта по ноябрь 2022 года.

Материалы и методы: исследование по выявлению генетических маркеров устойчивости к фторхинолонам было выполнено на 41 образце выделенной ДНК *M. genitalium*, собранных за период с марта по ноябрь 2022 г. Биологический материал представлен соскобами со слизистых оболочек уретры — 13 и цервикального канала — 28. Выделение ДНК *M. genitalium* проводили с использованием наборов «Рибо-Преп» «ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) и Проба-НК-Плюс («ДНК-технология», Россия). Выявление ДНК *M. genitalium* осуществляли на основе технологии ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с применением коммерческих наборов «АмплиПрайм®NCMT» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия), наборов реагентов «ФЕМОФЛОР®СКРИН»,

«ФЕМОФЛОР®16», «АНДРОФЛОР®СКРИН», «АНДРОФЛОР» («ДНК-технология», Россия) с использованием регистрирующих амплификаторов ДТ-96 и ДТ-lite («ДНК-технология», Россия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия). Все образцы, содержащие ДНК *M. genitalium*, передавались в центральную лабораторию (НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск) для дальнейшего тестирования на наличие генетических маркеров резистентности к фторхинолонам в рамках проекта DeMaRes (Detection of Macrolide Resistance — *Mycoplasma genitalium*). Для выявления типа мутаций использовался метод секвенирования по Сэнгеру соответствующих фрагментов гена с использованием наборов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора Applied Biosystems 3500 (Life Technologies, США).

Результаты: исследован 41 образец *M. genitalium*. Структура образцов распределилась следующим образом: на долю исследований урогенитального тракта женщин пришлось 68% (28/41), на долю исследований урогенитального тракта мужчин 32% (13/41). Лидирующую позицию занимают образцы ДНК, у которых мутации не были вы-

явлены — «дикий фенотип» 85.37% (35/41); у 14.63% (6/41) образцов выявлены мутации. Мутации, ассоциированные с резистентностью к фторхинолонам, локализовались в гене QRDR parC *M.genitalium* и распределились следующим образом: позиция D84N — 3 образца (3/41=7.32%); позиция S80I — 2 образца (2/41=4.88%); позиция S80R — 1 образец (1/41=2.44%). В ходе исследования выявлены штаммы *M.genitalium*, содержащие одновременно мутации устойчивости к фторхинолонам и макролидам. Количество таких изолятов за весь период наблюдения составило 12.95% (5/41). Изоляты *M.genitalium* с таким типом резистентности распределились следующим образом: позиции A2059G+S80I — 2 образца (2/41=4.88%); позиции A2059G+D84N — 2 образца (2/41=4.88%); позиции A2058G+D84N — 1 образец (1/41=2.44%). Таким образом наиболее частыми были мутации в позициях A2059G+S80I — (4.88%) и A2059G+D84N — (4.88%). Это самый распространенный фенотип устойчивости, отмеченный в различных исследованиях в Европе, США и странах Азии. Полученное нами данные (14.63%) выше аналогичного показателя (7,7%), опубликованного по данным метаанализа (Machalek et al., 2020). Такая же ситуация наблюдается с распространенностью мутаций, связанных с двойной

устойчивостью: (12.95%), что выше, чем в систематическом обзоре (2.8%) (Machalek et al., 2020). Причина этих расхождений может заключаться с одной стороны, в различии демографических характеристик обследованных популяций, а с другой, в различии профиля обследованных пациентов (клиники дерматовенерологического и общего амбулаторно-консультативного профиля).

Выводы: распространенность маркеров резистентности к фторхинолонам у *M. genitalium*, среди обследованных пациентов, составила 14.63% (6/41). Мутационный профиль, ассоциированный с резистентностью к фторхинолонам распределился следующим образом: позиция D84N — 3 образца (3/41=7.32%); позиция S80I — 2 образца (2/41=4.88%); позиция S80R — 1 образец (1/41=2.44%). На долю образцов — содержащих одновременно мутации устойчивости к фторхинолонам и макролидам пришлось 12.95%. Наиболее частыми были мутации в позициях A2059G+S80I — (4.88%) и A2059G+D84N — (4.88%). Полученные результаты подтверждают важность и актуальность проблемы резистентности *M. genitalium* к фторхинолонам для Республики Беларусь, демонстрируют необходимость внедрения эпидемиологического мониторинга за проблемой антибиотикорезистентности у *M. genitalium*.

Раздел 8. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ВНУТРИУТРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ВЛИЯНИЕ COVID-19, ПЕРЕНЕСЕННОГО ЖЕНЩИНАМИ РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА, НА ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К *LISTERIA MONOCYTOGENES*, ПРИВОДЯЩЕЙ К ЛИСТЕРИОЗУ НОВОРОЖДЕННЫХ

Воронина О.Л.¹, Кунда М.С.¹, Рыжова Н.Н.¹, Аксенова Е.И.¹, Кустова М.А.¹, Карпова Т.И.¹, Мелкумян А.Р.², Климова Е.А.³, Тартаковский И.С.¹

¹ ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии (НИЦЭМ) им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

² ГБУЗ Городская клиническая больница (ГКБ) им. Ф.И. Иноземцева ДЗМ, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет (МГМСУ) им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Пандемия COVID-19 оказала влияние на здоровье населения не только волнами подъема массовой заболеваемости вирусной инфекцией, но и теми отложенными последствиями, которые продолжают испытывать лица, перенесшие заболевание. Снижение иммунитета, изменения в микробном сообществе кишечного и респираторного трактов повышают риск заболеваемости другими инфекциями у пациентов, переболевших COVID-19. Мониторинг случаев инвазивного листериоза в клиниках Москвы, начатый в конце 2018 г., показал до пандемии преобладание клинических изолятов аутохтонного генотипа (Sequence Type, ST) ST7 филогенетической линии II (PLII) [1]. В период пандемии COVID-19 изменения в спектре генотипов *Listeria monocytogenes*, вызвавших заболевание в группах риска по инвазивному листериозу, происходили в соответствии с изменениями генотипов циркулировавших вирусов SARS-CoV-2 [2]. В группе переболевших COVID-19 не только пожилые люди были подвержены менингиту и септицемии, как проявлению инвазивного листериоза. Возраст пациентов с такой нозологией снизился до 31 года, доля умерших выросла в 1,57 раза по сравнению с 2018-2019 гг. [3].

Особому контролю подлежат случаи перинатального листериоза. Беременные, эмбрионы, плоды и новорожденные составляют отдельную группу риска. Во втором и третьем триместрах беременности у женщин снижается количество Т-хелперов, сокращается подвижность кишечника, что играет ключевую роль в движении мукуса, который является первой линией защиты от проникновения микроорганизмов в энтероциты. Малоподвижный мукус обогащается *Pseudomonadota* и *Actinomycetota*, в нем снижается концентрация протективных факторов: короткоцепочечных жирных кислот. Последствия COVID-19 усугубляют эти изменения.

Анализ *L. monocytogenes*, вызвавших перинатальный листериоз в период пандемии и после нее, входил в задачу нашего исследования

Материалы и методы. Все изоляты, выделенные при перинатальном листериозе с сентября 2020 по июль

2023 в клиниках Москвы, поступали в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи на основании распоряжения ДЗ г. Москвы №1393 от 05.05.2019. Беременные и родильницы имели в анамнезе лабораторно подтвержденный COVID-19, перенесенный ранее. Исследование изолятов проводили с помощью MLST (MultiLocus Sequence Typing) и полногеномного секвенирования с последующим биоинформационным анализом. Данные регистрировали в BIGSdb-Lm (<https://bigssdb.pasteur.fr/listeria/>) и в GenBank (PRJNA605697).

Результаты. Анализ генотипов изолятов выборки показал незначительное преобладание представителей филогенетической линии I (PLI) — 53% (ST1, ST4, ST6, ST194, ST219). *L. monocytogenes* генотипов PLI характеризуются гипервирулентностью [4]. Геномы изолятов ST1, ST4, ST6, ST219 содержат остров патогенности LIPI-3 (синтез листериолизина S), а геномы ST4 и ST194 — LIPI-4 (система транспорта сахаров, PTS). Роль LIPI-4 важна в преодолении бактерией плацентарного барьера. Чаще всего встречались *L. monocytogenes* ST6. Бактерии этого генотипа вызывали перинатальный листериоз и до пандемии. *L. monocytogenes* ST4, ST219, ST194 появились только в пандемию. Среди бактерий PLII произошли наиболее существенные изменения. *L. monocytogenes* ни одного из выявленных в пандемию и в последующее время генотипов: ST8, ST21, ST121, ST204, ST451 — не вызывали ранее перинатальный листериоз в Москве. До пандемии COVID-19 *L. monocytogenes* аутохтонного генотипа ST7 доминировали при этой нозологии. С 2020 г. в PLII доля изолятов ST451 была выше, чем других. Отметим, что изоляты ST451 имеют замену в лейцин-богатом домене интерналина А, аналогичную изолятам PLI, что важно для взаимодействия бактерии с Е-кадгеринном и проникновения в энтероциты. Изоляты ST121 и в странах Европы, и в России ранее ассоциировались только с продуктами питания, но не с клиническими случаями. Изоляты ST8 отмечены при вспышках листериоза в лечебно-профилактических учреждениях Германии [5], мы выявляли их на мясных производствах в Москве, но не обнаруживали до пандемии в случаях инвазивного листериоза. Отметим, что изоляты ST121 и ST8

несут конъюгативные плазмиды, относящиеся к группе G2 RepA, 62207 bp и 86632 bp, соответственно. Плазмиды содержат гены устойчивости к кадмию, другим тяжелым металлам, оксидативному стрессу, изменениям pH и осмоса.

Заключение. Выявление гиповирулентных изолятов в случаях перинатального листериоза свидетельствует о существенных изменениях в организме женщин репродуктивного возраста, перенесших COVID-19, что привело к восприимчивости *L. monocytogenes* генотипов, ранее не представлявших опасности для беременных. Усиление мер контроля продуктов питания, исключение из рациона беременных мясных, рыбных, молочных продуктов, не прошедших термообработку, будет способствовать снижению вероятности инфицирования *L. monocytogenes*.

Список литературы:

1. Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Кутузова А.В., и др. Листериоз. Генотипирование как ключ к выявлению возможного источника заражения. Клиническая

микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019; 21(4):261-273. doi: 10.36488/cmasc.2019.4.261273

2. Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., et al. Genomic characteristics of listeria that caused invasive listeriosis during the COVID-19 pandemic. LJRS. 2023; 23(5): 33-61. DOI: 10.17472/LJRS.

3. Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Карпова Т.И., и др. Итоги многоцентрового мониторинга возбудителя инвазивного листериоза в мегаполисе. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2023;100(3):143-154. doi: 10.36233/0372-9311-393.

4. Maury M.M., Tsai Y.H., Charlier C., et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. Nat. Genet. 2016;48(3):308-13. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.3501>.

5. Lachmann R., Halbedel S., Adler M., et al. Nationwide outbreak of invasive listeriosis associated with consumption of meat products in health care facilities, Germany, 2014–2019. Clin. Microbiol. Infect. 2021;27(7):1035.e1–e5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.020>.

Раздел 9. ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА В КРИМИНАЛИСТИКЕ И СУДЕБНОЙ МЕДИЦИНЕ

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТНИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ЛЮДЕЙ ПО РАЗЛИЧНЫМ НАБОРАМ ДНК-МАРКЕРОВ

Харьков В.Н., Вагайцева К.В., Колесников Н.А., Степанов В.А.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Россия

Введение. Генотипирование образцов ДНК является наиболее доказательным методом анализа биологического материала при производстве судебно-медицинской идентификационной экспертизы. Анализ особенностей структуры генофондов популяций человека по различным ДНК-маркерам, помимо фундаментальных аспектов, имеет важное значение и для разработки методов ДНК-идентификации. В течение последнего десятилетия для целей генетической идентификации личности активно разрабатываются различные маркерные наборы. Ключевым моментом в ДНК-идентификации являются вероятностные расчеты совпадения генотипов, основанные на референтных частотах аллелей в популяции, из которой происходит исследуемый ДНК-профиль. ДНК-идентификация в криминалистике основывается на анализе частоты встречаемости различных маркерных ДНК-локусов, локализованных в аутосомах, половых хромосомах (Y-хромосоме и X-хромосоме) и митохондриальной ДНК в различных биологических образцах. Она проводится по стандартизованным наборам аутосомных микросателлитов (STR) [1-4]. Проведенные ранее исследования показали, что информативность маркеров для ДНК-идентификации определяется генетическим разнообразием населения и требует выявления частот аллелей, индивидуализирующих и дифференцирующих параметры в различных популяциях. Не существует двух популяций с одинаковым генетическим портретом. Научные достижения в области популяционной генетики позволяют разработать новые и более эффективные наборы ДНК-идентификации и определения биологического родства и этнической принадлежности.

Цель исследования. Цель исследования заключается в анализе генофондов различных популяций по частотам SNP, STR, частотам гаплогрупп Y-хромосомы, этническим различиям гаплотипов, идентичным по происхождению блокам сцепления, уровню инбридинга и разработке новых подходов и наборов для ДНК-идентификации и определения этнической принадлежности человека по образцу его ДНК.

Результаты и заключение. Проведено популяционное исследование генофонда коренных народов России и сопредельных регионов на уровне анализа частот STR, SNP, гаплогрупп Y-хромосомы, протяженных аутосомных гаплотипов, маркирующих различные генетические пласты.

Полученные результаты свидетельствуют о высоком уровне генетической дифференциации населения Северной Евразии. Популяции Сибири выделяются на фоне других евразийских этносов значительно более высоким уровнем межэтнической и межрегиональной генетической дифференциации. Сибирские популяции наравне с дагестанскими обладают самыми длинными геномными участками гомозиготности и более имеют более высокую долю людей с длинными областями аутозиготности. У коренного населения Дагестана, существенный вклад вносят более протяженные регионы высокой гомозиготности, что свидетельствует о сильном инбридинге [5]. По аутосомным STR между различными популяциями также наблюдаются различия по частотам аллелей. Среди коренного населения Сибири максимальное количество гомозиготных блоков наблюдается у чукчей, коряков, нивхов и удэгейцев. Совокупность данных по структуре генофонда популяций Северной Евразии свидетельствует о наличии сильных региональных и популяционных различий, отражающих особенности формирования населения в условиях изоляции, отсутствия интенсивного потока генов и объединении разнородных по происхождению генетических компонент в составе генофондов отдельных этносов и родовых групп [6]. Кроме фундаментального значения, данное исследование имеет перспективу практического использования. Полученные результаты исследования могут быть применены в разработке систем и стандартов генетических маркеров ДНК-идентификации, разработки референтных баз данных для ДНК-тестирования и геномной регистрации. Применение возможно в области криминалистики, судебной медицины и ДНК-тестирования. Принципиально важной является необходимость проведения исследования коллекций популяционных образцов различных этнических групп. В последнее время в качестве средства описания генетического разнообразия в этносах и популяциях используются полногеномные наборы однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) численностью более нескольких миллионов, а также полногеномные данные. В ближайшей перспективе — значительное расширение баз данных полных геномов и высокоплотных биочипов в представительных выборках из различных популяций. Применение этих технологий позволит в значительной степени усилить идентификационную способность используемых в практике наборов систем генетических маркеров ДНК-и-

идентификации по сравнению с имеющимися в настоящее время. Внедрение новых технологий на основе различных ДНК-маркеров человека должно обеспечить использование высокоэффективных, оптимальных по стоимости методов генетической идентификации личности и определения этнической принадлежности. Дальнейшее развитие этого научно-практического направления повысит точность и достоверность определения таких результатов для раскрытия различных преступлений и позволит значительно сузить и уточнить списки подозреваемых с их привязкой к конкретной национальности.

Список литературы

1. Dib C., Faur S., Fizames C. et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites // Nature. — 1996. — V. 380. — № 6570. — P. 152-154.
2. Zhang J., Zhang J., Tao R. et al. A newly devised multiplex assay of novel polymorphic non-CODIS STRs as a valuable tool for forensic application // Forensic Sci Int Genet. — 2020. — V. 48. — P. 102341.
3. Иванов П.Л. Индивидуализация человека и идентификация личности: молекулярная биология в судебной экспертизе // Вестник российской академии наук. — 2003. — Т. 73. — № 12. — С. 1085-1097.
4. Кильчевский А.В., Янковский Н.К. Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов союзного государства // Генетика. — 2021. — Т. 57. — № 12. — С. 1345-1355.
5. Колесников Н.А., Харьков В.Н., Раджабов М.О., и др. Различия по уровню инбридинга в популяциях Дагестана: анализ регионов высокой гомозиготности // Медицинская генетика. — 2020. — Vol. 19. — № 7(216). — P. 21-22.
6. Колесников Н.А., Харьков В.Н., Зарубин А.А., Степанов В.А. Особенности распределения регионов высокой гомозиготности в геномах представителей коренного населения Северной Евразии // Генетика. — 2019. — Vol. 55. — № 10. — P. 1231-1236.

МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ НАБОР ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ 23 ПОЛИМОРФНЫХ STR-МАРКЕРОВ НЕ ВХОДЯЩИХ В МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ

Вагайцева К.В.¹, Скалин М.Д.², Колесников Н.А.¹, Харьков В.Н.¹, Раджабов М.О.³, Степанов В.А.¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физики им. Х.И. Амирханова» Дагестанского федерального исследовательского центра РАН, Россия

Актуальность. Современные наборы для ДНК-идентификации, включающие стандартные аутосомные микросателлитные маркеры, обладают высокой степенью идентификационной информативности. Не смотря на это работы по формированию новых мультиплексов продолжают [1-3]. Активная разработка так называемых не-CODIS- мультиплексов связана с потребностью в увеличении информативности генетической экспертизы при установлении родства как в случаях экспертизы в гражданских делах, так и при идентификации личности людей, погибших в авиакатастрофах, природных и техногенных пожарах, террористических атаках, ураганах, цунами и прочих крупномасштабных бедствиях [4,5]. Эффекты демографической истории человечества привели к тому, что коренные народы находящиеся на наибольшем географическом удалении по путям миграции, пройденным в ходе эволюции человека уступают по уровню генетического разнообразия популяциям Европы, что влияет на уровень идентификационной информативности стандартных криминалистических аутосомных маркеров в этих популяциях. Таким образом, для популяций Азии, жителей тихоокеанских островов и коренных американцев возрастает вероятность ложноположительной семейной идентификации [6]. Увеличение инфор-

мативности генетической тест-системы основанной на STR-маркерах возможно несколькими путями. Один из них — расширение панели используемых генетических маркеров путем добавления высокоинформативных аутосомных STR-маркеров. Доказано, что дополнительные STR могут повысить эффективность генетического тестирования в определении истинного родства между родителем и ребенком, родными или сводными братьями и сестрами при экспертизе в сложных случаях определения родственных отношений [7,8].

Цель исследования. Цель нашего исследования заключалась в разработке нового мультиплекса способного повысить надежность и эффективность генетической экспертизы в высокоинбредных популяциях Российской Федерации (народы Сибири и Дагестана).

Материалы и методы. Для оценки идентификационной информативности разрабатываемого мультиплекса в высокоинбредной популяции мы прогенотипировали выборку из 189 индивидов аварцев (Дагестан). На основе полученных данных о генотипах стандартным способом рассчитали значения исключительной способности (PE — power of exclusion) характеризующей информативность генетических маркеров при определении родственных отношений.

Результаты. Отбирая маркеры для мультиплекса, мы учитывали их уровень генетического разнообразия в мировых популяциях, наличие стабильной фланкирующей области, а также структуру повтора. В приоритете находились локусы, входящие в перечень рекомендованных Национальным Институтом Стандартов и Технологий (NIST). В итоге в состав набора вошли следующие генетические маркеры: D20S1082, D6S474, D12ATA63, D4S2366, D1S1677, D11S4463, D9S1122, D2S1776, D10S1435, D3S3053, D5S2500, D1S1627, D3S4529, D2S1360, D17S974, D3S1744, D9S2157, D17S1301, D8S1132, Penta D, D21S2050, D7S1517, Penta E. Все маркеры ранее использовались для ДНК-идентификации в мировой практике, однако набора, включающего весь перечень отобранных STR-локусов, ранее не существовало. Исключающая способность всей совокупности маркеров нового мультиплекса составила 0,99999988, для сравнения значение PE для совокупности 20 стандартных аутосомных STR в этой же популяции равняется 0,9999993. При этом совокупное значение исключающей способности по 43 аутосомным STR в популяции аварцев составит 0,9999999999992.

Заключение. Показано, что новый мультиплекс является высокоинформативным инструментом для ДНК-идентификации и может быть самостоятельной альтернативой существующим криминалистическим тест-системам, основанным на STR-маркерах аутосом. Также стоит отметить, что простая структура большинства STR в мультиплексе и наличие стабильной фланкирующей области снижает вероятность ошибок амплификации. Наличие в мультиплексе пентануклеотидных STR (Penta E, Penta D) помимо классических три- и тетра-нуклеотидных маркеров позволит эффективно отличать смешанные образцы ДНК за счёт низких сигналов статтеров, что особенно актуально в следственной экспертизе. Используемая в мультиплексе нормирующая амплификация позволяет использовать ДНК в широком диапазоне концентраций, в связи с чем измерение кон-

центрации образца перед генотипированием не требуется. В дальнейшем будет проведена оценка качества генотипирования и информативности набора для большого числа популяций коренных народов Российской Федерации.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования № 122112800026-1

Список литературы:

1. Zheng H., Tao R., Zhang J. et al. Development and validation of a novel SiFaSTRM 23-plex system // *Electrophoresis*. — 2019. — V. 40. — № 20. — P. 2644-2654.
2. Zhang J., Zhang J., Tao R. et al. A newly devised multiplex assay of novel polymorphic non-CODIS STRs as a valuable tool for forensic application // *Forensic Sci Int Genet*. — 2020. — V. 48. — P. 102341.
3. Zhang J., Yang Z., Zhang X. et al. Genetic characterization of 21 autosomal STR loci of Goldeneye™ DNA ID 22NC Kit in Chinese She group // *Leg Med (Tokyo)*. — 2019. — V. 39. — P. 45-48.
4. Li L., Lin Y., Liu Y. et al. A case of false mother included with 46 autosomal STR markers // *Investig Genet*. — 2015. — V. 6. — P. 9.
5. Karlsson A.O., Holmlund G., Egeland T. et al. DNA-testing for immigration cases: the risk of erroneous conclusions // *Forensic Sci Int*. — 2007. — V. 172. — P. 144-149.
6. Rohlf S.R., Fullerton S.M., Weir B.S. Familial identification: population structure and relationship distinguishability // *PLoS Genet*. 2012. T. 8. № 2. С. e1002469. doi: 10.1371/journal.pgen.1002469
7. Butler J.M., Hill C.R., Decker A.E. et al. New Autosomal and Y-Chromosome STR Loci: Characterization and Potential Uses* / *Proceedings of the 18th International Symposium on Human Identification*. — 2007.
8. O'Connor K. L., Butts E., Hill C. R. et al. Evaluating the effect of additional forensic loci on likelihood ratio values for complex kinship analysis / *The 21st International Symposium on Human Identification*. — 2010.

ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЛИМОРФИЗМА AX-116263147 ДЛЯ РАЗЛИЧЕНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДОВ *SUS SCROFA SCROFA* И *SUS SCROFA DOMESTICUS*

Кипень В.Н.¹, Патрин М.М.²

¹ Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь 2000 «Максим Медикал», Москва, Россия

² ООО «Максим Медикал», Москва, Россия

Введение. В период 2014–2016 гг. произошла резкая депопуляция дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) на территории Республики Беларусь — с 80 тыс. особей (по состоянию на 2010 г.) до около 3 тыс. особей. Причина данного факта — проводимые административные приемы для массового уничтожения данного вида как потенциального разносчика африканской чумы свиней. Вид *Sus scrofa* отличается высокой плодовитостью, и через 10–15 лет способен будет

восстановить свою численность до уровня, сопоставимого с показателями 2014 г., при условии отсутствия кардинальных и жестких мер административного характера. В то же время, эксперты-криминалисты продолжают сталкиваться с необходимостью дифференцировать образы, принадлежавшие дикому кабану, от образцов домашней свиньи.

Ранее нами была предложена модель, включающая 3 SNP — H3GA0051814 (HEPH), c.367G>A (MC1R) и

g.299084751C>T (*NR6A1*), — и способная с высокой точностью дифференцировать биологические образцы, принадлежащие *Sus scrofa scrofa* и *Sus scrofa domesticus* [1]. Однако дальнейший поиск и анализ SNP, которые могли бы быть включены в тест-систему, не потерял своей актуальности, т.к. полиморфизм H3GA0051814 (*HEPH*) расположен на X-хромосоме и подвержен иным условиям наследования, чем полиморфизмы c.367G>A (*MC1R*) и g.299084751C>T (*NR6A1*), расположенные на аутосомах.

Цель и задачи. С использованием методов биоинформатики провести определение генотипа для SNP AX-116263147, оценить его дифференцирующий потенциал, а также протестировать его на небольшой выборке образцов *Sus scrofa scrofa* и *Sus scrofa domesticus*.

Материалы и методы. Для биоинформатического анализа были использованы геномы животных, представленные в открытом доступе в формате SRA (Sequence Read Archive), которые дополнительно конвертировали в формат *.fasta с использованием пакета SRA-Toolkit v.2.11. Для автоматизации процесса поиска нуклеотидных последовательностей *in silico*, фланкирующих искомый аллель, использовали скрипт, написанный на языке программирования Python v.3.10, в среде разработки программного обеспечения Jupyter Notebook. В результате биоинформатического анализа 254 SRA файлов *Sus scrofa domesticus* и 63 SRA файлов *Sus scrofa scrofa* из проектов PRJNA671763, PRJNA626370, PRJNA622908, PRJNA553106, PRJNA550237, PRJNA485589, PRJNA41185, PRJNA393920, PRJNA378496, PRJNA309108, PRJNA260763, PRJNA255085, PRJNA507853, PRJNA506339, PRJNA488960, PRJNA487172, PRJNA520978, PRJNA176478, PRJEB9922, PRJEB1683, PRJNA369600, PRJNA358108 PRJNA343658, PRJNA322309 и PRJNA239399 проведено определение генотипа *in silico* для SNP AX-116263147 (rs341244475, Chr.5:55841466G>T). Биологическим материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы ДНК 76 домашних свиней (выборка «SWINE») и 27 диких кабанов (выборка «WILD BOAR»). Рассчитаны частоты распространенности гено-

типов и аллелей в двух выборках. Дифференцирующий потенциал SNP определяли с использованием ROC-анализа в SPSS v.20.0. При наличии нижней границы асимптотического 95% доверительного интервала более 0,8 для параметра AUC (площадь под кривой) полиморфизм позиционировался как генетический маркер с высоким дифференцирующим потенциалом.

Основные результаты. По данным молекулярно-генетического анализа для полиморфизма AX-116263147 частота распространенности генотипа GG в выборке «SWINE» составила 11,8%, генотипа TG — 7,9%, генотипа TT — 80,3%. Соответственно, частота аллеля G составила 15,8%, аллеля T — 84,2%.

Для полиморфизма AX-116263147 частота распространенности генотипа GG в выборке «WILD BOAR» составила 100%, генотипы TG и TT обнаружены не были. Соответственно, частота аллеля G составила также 100%.

Значение параметра AUC составило 0,941 (p-level — 1.18E-14). На основании проведенного биоинформатического анализа, дифференцирующий потенциал данного SNP оказался аналогичным, значение AUC составило 0,951 (p-level — 4.22E-17).

Заключение. Таким образом, на практическом материале подтвержден дифференцирующий потенциал SNP AX-116263147 (rs341244475, Chr.5:55841466G>T) для различения биологических образцов, принадлежащие *Sus scrofa scrofa* и *Sus scrofa domesticus*. В перспективе планируется расширить исследования в данной области: увеличить выборки и провести совместный анализ нескольких SNP для модификации ранее предложенной модели дифференциации.

Биоинформатический анализ выполнен в рамках НИР Б23-060 (БРФФИ, 2023-2025 гг.)

Литература:

1. Kipen V.N., Ivanova E.V., Snytkov E.V., Verchuk A.N. Analysis of *HEPH* gene polymorphism on the X chromosome for identification of wild boar and domestic pig // Russian Journal of Genetics. 2020. V..56(9). pp.1099-1108. DOI: DOI: 10.1134/S1022795420080062

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОНОЗИГОТНЫХ БЛИЗНЕЦОВ В СУДЕБНОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ (СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ)

Перепечина И.О.^{1,2}

¹ Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

² Федеральное государственное казенное образовательное учреждение высшего образования «Московская академия Следственного комитета Российской Федерации», Москва, Россия

Введение. Возможность прохождения по уголовно-му или гражданскому делу монозиготных близнецов, как следует из правоприменительной практики, не умогнрительна. Рождение монозиготных близнецов происходит не столь редко - частота рождения такой пары составляет примерно 3 случая на 1000 родов (Bortolus R. et al., 1999). Однако принятые на вооружение экспертными службами

методы ДНК-идентификации на практике не позволяют различать монозиготных близнецов, у них выявляются идентичные генетические профили. Это создает серьезные проблемы для судопроизводства, особенно в тех случаях, когда органы расследования и суд располагают крайне скудной доказательственной базой за рамками экспертизы.

Несмотря на то, что монозиготные близнецы, происходя из одной и той же зиготы, рождаются с одинаковым генотипом, потенциальные возможности для различения монозиготных близнецов, тем не менее, существуют и обусловлены мутационным процессом. Кроме того, на развитие организма, помимо последовательности ДНК, влияют также эпигенетические факторы, и, таким образом, эпигенетические маркеры также могут иметь дискриминирующее значение. Представляется актуальным провести анализ имеющихся данных в реализации указанных выше предпосылок для различения и идентификации монозиготных близнецов в условиях прогресса молекулярно-генетических технологий.

Целью данной работы является исследование современного состояния и перспектив молекулярно-генетических исследований для решения вопросов идентификации личности и установления родства в случаях монозиготных близнецов.

Материалы и методы. Анализу подлежали имеющиеся в научной литературе и материалах судебной практики данные, касающиеся использования молекулярно-генетических методов с целью различения монозиготных близнецов и идентификации конкретного близнеца из близнецовой пары. Изучались результаты исследований ядерной и митохондриальной ДНК, выполненных с использованием различных молекулярно-генетических технологий, применения эпигенетических методов исследования.

Основные результаты. Исследованиями последних лет показано, что монозиготные близнецы могут демонстрировать очень небольшую степень генетических различий последовательностей ядерной ДНК в виде однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), вариаций числа копий, сателлитной ДНК Y-хромосомы и др. Выявление у одного из проходящих по делу монозиготных близнецов мутации *de novo* в исследованных STR-локусах принципиально возможно, однако это редкое событие. Такой случай описан L.F. Wang и соавт. [1]. Кардинально важным для решения проблемы дифференциации монозиготных близнецов явилась разработка метода массивного параллельного секвенирования, или секвенирования следующего поколения (NGS). Использование сверхглубокого секвенирования позволило выявить пять однонуклеотидных полиморфизмов, присутствующих в ДНК одного из монозиготных близнецов и у его ребенка, но не у брата-близнеца [2]. Описаны разные подходы к применению NGS для дифференциации монозиготных близнецов. Перспективным для дифференциации близнецов считают исследование митохондриального генома (Parson W. et al., 2013).

У монозиготных близнецов могут также выявляться эпигенетические различия, особенно в более позднем возрасте (Fraga M.F. et al., 2005). Сообщалось о значительных различиях в метилировании ДНК между монозиготными близнецами (Vidaki A. et al., 2017; Li C. et al., 2011). В отличие от стабильных последовательностей геномной ДНК, эпигенетические маркеры, особенно метилирование ДНК, более динамичны. Однако на метилирование ДНК могут влиять факторы окружающей среды; паттерны экспрессии в разных тканях могут иметь различия.

Описано установление в образцах крови монозиготных близнецов различий профилей экспрессии микроР-

НК; как ограничение отмечается то, что РНК не стабильна и легко разрушается (Xiao C. et al., 2019).

Недавними исследованиями (Menga D. et al., 2023) показано, что в качестве потенциального биологического маркера для различения монозиготных близнецов можно исследовать иммунологический репертуар, отражающий уникальную иммунную историю индивидуума. Это возможно как на основе анализа полиморфизма длины последовательности, так и на основе анализа полиморфизма последовательности; при этом маркеры относительно стабильны.

Методы идентификации монозиготных близнецов уже находят применение в правоприменительной практике. В уголовном деле, возбужденном в связи с изнасилованием, результаты STR-анализа подтвердили версию о причастности подозреваемого не только к расследуемому преступлению, но и к трем преступлениям, совершенным ранее. Однако те же результаты были получены с образцами брата-близнеца подозреваемого. Далее исследование проводили с помощью комбинации полногеномного секвенирования, аллель-специфической ПЦР и секвенирования с глубоким ампликоном (deep amplicon sequencing). Информативность анализа митохондриальной ДНК для различения близнецов была выше, чем анализа ядерной ДНК. Однонуклеотидные полиморфизмы, обнаруженные в mtDNA, позволили успешно идентифицировать подозреваемого при исследовании объектов, относящихся ко всем четырем случаям, включая преступление, которое было совершено более десяти лет назад [3].

Заключение/выводы. На современном этапе развития методов молекулярно-генетического анализа даже минимальные различия между монозиготными близнецами потенциально могут быть детектированы, и совокупность их использована для различения и идентификации близнецов в интересах судопроизводства. Несмотря на ограничения, которые имеет любой из методов в случае исследования экспертного материала, принципиально возможно разрешение в судебных делах вопросов, которые ранее не представлялось возможным разрешить. Актуальны разработка оптимальных методических подходов и алгоритмов исследования при решении экспертных задач, связанных с монозиготными близнецами, валидация методов.

Список использованной литературы.

1. Wang L.F., Ying Yang Y., Zhang X.-N. et al. Tri-allelic pattern of short tandem repeats identifies the murderer among identical twins and suggests an embryonic mutational origin. *Forensic Science International: Genetics*. 2015;16:239–245.
2. Weber-Lehmann J., Schilling E., Gradl G. et al. Finding the needle in the haystack: Differentiating “identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Science International: Genetics*. 2014;9(1):42–46.
3. Yuan L., Chena X., Liu Z. et al. Identification of the perpetrator among identical twins using next generation sequencing technology: A case report. *Forensic Science International: Genetics*. 2020;44(1):102167.

ПОИСК ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ С ВЫСОКИМ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИМ ПОТЕНЦИАЛОМ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДОВ *CANIS LUPUS* И *CANIS LUPUS FAMILIARIS*

Кипень В.Н.

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Введение. Дифференциация (различение) биологических образцов, принадлежащих животным видам *Canis lupus* и *Canis lupus familiaris*, с использованием SNP (Single Nucleotide Polymorphism) является актуальной задачей как при решении ряда популяционно-генетических задач, так и в отношении приложений криминалистической направленности.

Ранее проведенный нами анализ с использованием методов биоинформатики (проекты PRJNA263947, PRJNA319610, PRJNA358192, PRJNA417738, PRJNA448733, PRJNA494815, PRJNA517114) позволил выделить несколько значимых для дифференциации образцов волк/собака SNP, например, g.27748425T>C (ген *ADCY8*) и g.1414373T>C (ген *RYR3*). Дифференцирующий потенциал для SNP был оценен как очень высокий: g.27748425T>C (*ADCY8*) — AUC = 0,949 (95% ДИ 0,933-0,965, p=2,77E-21); для SNP g.1414373T>C (*RYR3*) — AUC = 0,874 (95% ДИ 0,817-0,931, p=3,20E-15) [1]. Согласно полученным результатам, сбалансированная точность модели из двух SNP составила 96,2% (специфичность модели — 96,3%, чувствительность — 98,9%). Однако для повышения специфичности модели необходим поиск и апробация новых SNP для дальнейшего улучшения предложенной модели.

Цель и задачи. С использованием методов биоинформатики провести поиск и анализ SNP с высоким дифференцирующим потенциалом для различения особей биологических видов *Canis lupus* и *Canis lupus familiaris*.

Материалы и методы. Для биоинформатического анализа были использованы геномы животных, представленные в открытом доступе в формате SRA (Sequence Read Archive), которые дополнительно конвертировали в формат *.fasta с использованием пакета SRA-Toolkit v.2.11. Для автоматизации процесса поиска нуклеотидных последовательностей *in silico*, фланкирующих искомый аллель, использовали скрипт, написанный на языке программирования Python v.3.10, в среде разработки программного обеспечения Jupyter Notebook. В результате расширенного биоинформатического анализа SRA файлов из проектов PRJEB20635, PRJEB34110, PRJEB39198, PRJEB42199, PRJEB43408, PRJEB44869, PRJNA192935, PRJNA208087, PRJNA232497, PRJNA255370, PRJNA263947, PRJNA274504, PRJNA319610, PRJNA358192, PRJNA389294, PRJNA389682, PRJNA448733, PRJNA494719, PRJNA512209, PRJNA517114, PRJNA543877, PRJNA559966 и PRJNA648123) на Chr.1 (NC_006583.3), Chr.13 (NC_006595.3) и Chr.30 (NC_006612.3) проведено определение генотипа *in silico* для 381 SNP. Рассчитаны частоты распространенности генотипов и аллелей в двух выборках («WOLF» — *Canis lupus* [n=200], «DOG» — *Canis lupus familiaris* [n=400]). На основании этих значений рассчитан ABS — интегральный показатель информативности локуса для дифференциации.

Основные результаты. Полученные результаты суммированы в таблице.

SNP*	Хромосома	Позиция**	ABS, (DOG — WOLF), %	Разница между частотой аллелей А и В, %	
				DOG	WOLF
SNP_076	1	4886951	1,742	81,835	83,577
SNP_479	30	1119862	2,435	87,220	89,655
SNP_555	30	1396653	2,501	73,930	71,429
SNP_074	1	4882549	6,301	84,346	90,647
SNP_488	30	1177303	8,301	71,429	79,730
SNP_539	30	1351290	8,697	66,869	75,566
SNP_376	13	27783448	16,849	86,998	70,149
SNP_385	13	27803706	17,087	61,589	78,676
SNP_006	1	4419221	19,851	62,630	82,482
SNP_118	1	4979537	20,199	73,134	93,333
SNP_265	1	108607110	20,666	68,750	89,416
SNP_126	1	17610117	22,201	54,291	76,493
SNP_259	1	108585733	24,288	66,966	91,255

SNP_091	1	4915001	27,914	67,086	95,000
SNP_047	1	4711650	28,069	57,749	85,818
SNP_451	30	972855	28,818	65,191	94,009
SNP_485	30	1165431	29,232	62,934	92,166
SNP_298	1	108674441	30,182	59,180	89,362
SNP_489	30	1180938	30,227	62,500	92,727

*собственный код SNP

**CanFam3.1 (GCF_000002285.3)

Выявлено 19 SNP с высоким дифференцирующим потенциалом. SNP располагались на всех трех проанализированных хромосомах. Для SNP Chr.1:4886951A>G и Chr.30:1119862T>C рассчитанное значение ABS составило 1,742% и 2,435% соответственно. Для остальных SNP это значение было больше. В целом, впоследствии будут расширены выборки «WOLF» и «DOG», актуализированы расчеты и проведена апробация.

Заключение. Выявлено 19 SNP с высоким дифференцирующим потенциалом для различения особей биологических видов *Canis lupus* и *Canis lupus familiaris*. Полученный результат предстоит проверить на вы-

борке биологических образцов из Беларуси и России. Биоинформатический анализ выполнен в рамках НИР Б23-060 (БРФФИ, 2023-2025 гг.).

Литература:

1. Анализ полиморфизма генов ADCY8 и RYR3 для установления принадлежности биологических образцов к диким или домашним представителям вида *Canis lupus* / Кипень В.Н., Патрин М.М., Снытков Е.В., Верчук А.Н., Семак А.Н. // Генетика. 2023. Т.59. №3. С.336-344. DOI: 10.31857/S0016675823030062

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДНК ИДЕНТИФИКАЦИИ, ДНК ФЕНОТИПИРОВАНИЯ

Тазетдинов А.М.¹, Тахирова З.Р.¹, Хуснутдинова Э.К.^{1,2}

¹ Уфимский университет науки и технологий (УУНУТ), Уфа, Россия

² Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

Актуальность, введение. Идентификацию личности преступника, совершившего противоправное действие, установление личности неопознанного трупа, определение биологического родства (отцовства, материнства) невозможно представить без исследования ДНК. Суть проведения ДНК идентификации сводится к изучению определенных маркеров-микросателлитов. Участок ДНК с определенной геномной локализацией, содержащий короткие tandemные повторы, называют *микросателлитом (STR-локусом)*. Аллель STR-локуса — это окаймленный определенной парой праймеров фрагмент ДНК, содержащий известное число исследуемых повторов. В зависимости от длины повтора их классифицируют на локусы с моно-, ди-, три-, тетра-, пента-, и гексануклеотидными повторами. Небольшие размеры микросателлитных локусов позволяют применить метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), обеспечивающей многократное увеличение числа копий (амплификацию) данного фрагмента ДНК в формате мультиплексной реакции с использованием большого количества коммерческих наборов, позволяющих проводить одновременную амплификацию по нескольким локусам. Дифференциация продуктов ПЦР

с различными размерами и определенными метками посредством проведения капиллярного электрофореза, с использованием специальных маркеров молекулярного веса, лэддера-фрагментов ДНК аллелей с известным числом повторов, специализированного программного обеспечения позволяет провести фрагментный анализ и рассчитать размер аллеля в терминах числа повторов.

Материалы и методы. Амплификация достигается в ходе циклического комплементарного достраивания ДНК-матрицы с помощью термостабильной *Taq*-полимеразы, цикличность обеспечивается программируемыми термостатами (амплификаторами). Синтез определенного участка ДНК инициируется ДНК-затравками в виде пары *праймеров*— синтетических олигонуклеотидов, комплементарных нуклеотидным последовательностям на границах исследуемого фрагмента. Значительный полиморфизм микросателлитов обеспечивает возможность с высокой вероятностью идентифицировать личность и выявить биологическое родство для судебно-медицинских исследований, в том числе для анализа костных остатков, а высокие темпы мутирования STR-локусов позволяют проводить детальный анализ популяционной структуры вследствие

накопления популяционно-специфических мутаций.

Анализ современных литературных данных свидетельствует об использовании определенных ДНК маркеров для установления внешности: цвета волос, кожи, глаз (ДНК фенотипирование). Система ДНК фенотипирования, реализованная в Hiris PlexS [1], предполагает идентификацию определенных нуклеотидных изменений, использование соответствующей программной обработки полученных данных для определения цвета волос, кожи, глаз. Необходимо отметить, что выборка для данной системы включает жителей Европы, а не России.

Цель. В связи с этим является актуальным исследование определенных маркеров, имеющих большое значение для определения фенотипа у индивидов из российской

популяции с учетом этнической принадлежности и географической локализации. Дальнейшее исследование и увеличение генографического атласа ДНК-маркеров (помимо 62, предложенных Балановской Е.В.[2]), контролирующих цвета глаз и волос на наших выборках позволит получить максимально корректную информацию о распределении частот аллелей и генотипов интересующих маркеров, которую в дальнейшем после верификации и валидации можно, например, применять для раскрытия преступлений, установления личности трупа путем реконструкции внешнего облика. В нижеприведенной таблице приведены ОНП (SNP), исследованные Балановской Е.В. с коллегами [2], частично перекрывающиеся со списком, включенным в панель The HirisPlex-S System [1].

ТАБЛИЦА. СПИСОК ОНП (SNP), ПРЕДСТАВЛЯЮЩИХ ИНТЕРЕС ДЛЯ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ

SNP	Ист.1	Ист.2	SNP	Ист.1	Ист.2	SNP	Ист.1	Ист.2
rs312262906	+	-	rs2378249	+	-	rs8051733	+	++
rs11547464	+	-	rs12896399	+	+	rs12916300	-	++
rs885479	+	-	rs1393350	+	+	rs6804480	-	++
rs1805008	+	-	rs683	+	-	rs35407	-	++
rs1805005	+	-	rs3114908	+	+	rs3827760	-	++
rs1805006	+	-	rs1800414	+	-	rs71396951	-	++
rs1805007	+	++	rs10756819	+	-	rs2820339	-	++
rs1805009	+	-	rs2238289	+	++	rs72856153	-	++
rs201326893	+	-	rs17128291	+	-	rs1999528	-	+
rs2228479	+	+	rs6497292	+	-	rs4238832	-	+
rs1110400	+	-	rs1129038	+	++	rs34191540	-	+
rs28777	+	++	rs1667394	+	-	rs2871886	-	+
rs16891982	+	-	rs1126809	+	-	rs75570604	-	+
rs12821256	+	-	rs1470608	+	-	rs7494942	-	+
rs4959270	+	-	rs1426654	+	+	rs11283625	-	+
rs12203592	+	-	rs6119471	+	-	rs685034	-	+
rs1042602	+	+	rs1545397	+	-	rs12588868	-	+
rs1800407	+	-	rs6059655	+	++	rs11228497	-	+
rs2402130	+	-	rs12441727	+	-	rs12915889	-	++
rs12913832	+	++	rs3212355	+	-			

Примечание: знаком «++» отмечены локусы с «высоким вкладом в определение цвета глаз и волос», «+»- с «небольшим вкладом в определение цвета глаз и волос», Ист. 1 и Ист. 2-соответствующие источники из списка использованной литературы.

Выводы, результаты. Полученные результаты (анализ литературы) планируется использовать для разработки тест-систем: наличие генетического профиля по STR

локусам вкпе с определенными фенотипическими признаками позволит существенно облегчить задачи идентификации личности посредством поиска и обнаружения

подозреваемого и/или безвестно исчезнувшего человека с определенными внешне видимыми характеристиками.

Список использованной литературы:

1. <https://hirisplex.erasmusmc.nl/>;
2. Балановская Е.В., Горин И.О. и др. Геноеографический атлас ДНК-маркеров, контролирующих цвет глаз

и волос человека. // ГЕНЕТИКА. 2021, Т.57, № 12, с. 1356–1375.

Исследование поддержано мегагрантом Правительства Республики Башкортостан (Договор № 1 от 02.12.2022), государственным заданием Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-03-2021 193/5 (Соглашение от 30 сентября 2021 года).

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХЛОРОПЛАСТНЫХ МАРКЕРОВ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PINUS* В КРИМИНАЛИСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

Верчук А.Н.^{1,2}

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

² Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь

Введение. Один из ключевых вопросов судебно-экспертного исследования растительных объектов связан с установлением видового происхождения исследуемого материала. Наиболее часто в судебно-экспертных исследованиях встречаются доминирующие на данной территории виды растений. На территории Республики Беларусь сосна (*Pinus*) играет ведущую роль в образовании лесных массивов и является экономически значимым родом древесных растений.

Цель работы — анализ с использованием методов биоинформатики хлоропластных маркеров ДНК-штрихкодирования для оценки эффективности дифференциации наиболее распространенных в Республике Беларусь представителей рода *Pinus* в криминалистических целях.

Материалы и методы. На территории Республики Беларусь род *Pinus* представлен семью наиболее распространенными видами: *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra*, *Pinus rigida*, *Pinus banksiana*, *Pinus strobus*, *Pinus cembra* и *Pinus mugo*. Оценка

эффективности ДНК-штрихкодов для дифференциации этих видов была проведена с помощью биоинформатического анализа наиболее часто используемых хлоропластных маркеров (*PsbA-trnH*, *MatK*, *rbcL*) штрихкодирования. По исследуемым маркерам было проанализировано 360 последовательностей, которые загружены из базы данных Национального центра биотехнологической информации (англ. National Center for Biotechnology Information, NSBI), локальное выравнивание осуществлялось с помощью функции Clustal W программы BioEdit. Статистический анализ был проведен программой MEGA X v.10.2.4, используя двухпараметрическую модель Кимуры (англ. Kimura 2-parameter, K2P) с построением политомической филограммы, используя дискретный метод наибольшего правдоподобия (Test Maximum likelihood method). Количество анализируемых последовательностей ДНК-штрихкодов по исследуемым маркерам и результаты их статистического анализа представлены в таблице.

Исследуемый маркер	<i>PsbA-trnH</i>	<i>MatK</i>	<i>rbcL</i>
Количество исследуемых штрихкодов	102	103	155
Количество анализируемых видов	7	7	7
Длина маркера (п.н.)	≈720	≈1500	≈1115
Среднее значение внутривидовой дистанции	0,0012	0,0020	0,0009
Среднее значение межвидовой дистанции	0,0209	0,0232	0,0144
Количество гаплотипов	14	22	27
Видодифференцирующие гаплотипы	12	20	27
Кол-во видов, дифференцирующихся со 100% вероятностью	4	5	7
Однозначная идентификация (%)	53	66	100
Неоднозначная идентификация (%)	47	34	0

Результаты и обсуждение. Анализируя полученные результаты, которые представлены в таблице, можно сделать выводы, что самое высокое среднее значение внутривидовой дистанции (*d*) наблюдалось для маркера *MatK*. Для данного маркера основной вклад в внутривидовую дистанцию был внесен образцом *Pinus cembra*, последовательность которого сильно отличалась от основного массива. Несмотря на это для всех маркеров отношение межвидовой к внутривидовой дистанции было более 10, что говорит о высоком потенциале исследуемых маркеров для дифференциации исследуемых видов.

Наиболее эффективным для решения поставленной задачи оказался маркер *rbcl*, с помощью которого было выявлено 27 гаплотипов. Поскольку все выявленные гаплотипы были уникальны для определенных видов, то с помощью данного маркера однозначно дифференцировались все исследуемые образцы, что приблизило эффективность данного маркера для исследуемого таксона к 100%.

Остальные маркеры ДНК-штрихкодирования показали более низкую эффективность, как по общему количеству выявленных гаплотипов, так и по гаплотипам, характерным только для одного вида. Это привело к снижению эффективности ДНК-штрихкодов, с помощью которых однозначно дифференцировались 53% и 66% исследуемых образцов при использовании маркеров *trnH-psbA* и *MatK* соответственно.

Последовательности маркера *trnH-psbA* для *Pinus sylvestris* имеют ряд замен, которые позволяют уверенно определить данный вид. Однако были установлены нуклеотидные последовательности, которые идентичны в парах *Pinus sylvestris* и *Pinus mugo*, *Pinus sylvestris* и *Pinus nigra*, что указывает на невозможность применения данного маркера для точной дифференциации этих видов у рода *Pinus*. Для остальных исследуемых видов (*Pinus rigida*, *Pinus*

banksiana, *Pinus strobus*, *Pinus cembra*) было выявлено 11 гаплотипов, которые позволяли устанавливать вид.

Маркер *MatK* позволил верно определить 5 из 7 исследуемых видов, за исключением *Pinus sylvestris* и *Pinus mugo* для которых было установлено два общих гаплотипа. Однако точно установить вид *Pinus sylvestris* возможно, благодаря наличию трех уникальных гаплотипов, частота встречаемости которых значительно ниже.

Выводы. Проанализировав 360 последовательностей, был установлен высокий дифференцирующий потенциал хлоропластных маркеров *psbA-trnH*, *matK*, *rbcl* для установления видовой принадлежности наиболее распространенных в Республике Беларусь представителей рода *Pinus*. Вопрос установления видового происхождения биологического материала рода *Pinus* возможно успешно решить с помощью хлоропластного маркера *rbcl*, который эффективно дифференцирует все виды характерные для территории Республики Беларусь.

Объекты судебно-экспертного исследования поступают различной степени сохранности и не редко в малых количествах, что не всегда позволяет выделить достаточное количество качественной ДНК для амплификации длинных последовательностей. Использование коротких последовательностей исследуемых маркеров для криминалистических целей более приемлемо, что приведет к увеличению эффективности. Поэтому выявленный потенциал остальных маркеров (*psbA-trnH* и *matK*), которые показали достаточно высокую эффективность, возможно использовать для подтверждения полученных результатов и повышения достоверности получаемых результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант № B22M-068 от 04.05.2022.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯДЕРНЫХ МАРКЕРОВ ITS-РЕГИОНА ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PINUS* В КРИМИНАЛИСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

Верчук А.Н.^{1,2}

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

² Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь

Введение. На изъятых с места происшествия вещественных доказательствах зачастую можно обнаружить следы растений (фрагменты листьев, пыльца и т.д.), которые могут дополнить картину преступления или места происшествия. Получить необходимую информацию возможно с помощью молекулярно-генетических методов исследования, однако первоочередной задачей для судебной экспертизы является установление видовой принадлежности изучаемого объекта.

На территории Республики Беларусь род сосны (*Pinus*) является наиболее распространённым древесным растением, которое играет значимые экономическую и экологи-

ческую роли. По этой причине представители данного рода часто становятся объектами исследования.

Целью работы являлась оценка эффективности ядерных маркеров ДНК-штрихкодирования в криминалистических целях для дифференциации наиболее распространенных в Республике Беларусь представителей рода *Pinus* с помощью биоинформатического анализа.

Материалы и методы. На территории Республики Беларусь род *Pinus* представлен семью наиболее распространенными видами: *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra*, *Pinus rigida*, *Pinus banksiana*, *Pinus strobus*, *Pinus cembra* и *Pinus mugo*. Оценка

эффективности ядерных ДНК-штрихкодов для дифференциации исследуемых видов была проведена с помощью биоинформатического анализа ITS-региона по маркерам *ITS1* и *ITS2*. По исследуемым маркерам были проанализированы последовательности, которые загружены из базы данных Национального центра биотехнологической информации (англ. National Center for Biotechnology Information, NSBI), локальное выравнивание осуществлялось с помощью функции Clustal

W программы BioEdit. Статистический анализ был проведен программой MEGA X v.10.2.4, применяя двухпараметрическую модель Кимуры (англ. Kimura 2-parameter, K2P) с построением политомической филограммы, используя дискретный метод наибольшего правдоподобия (Test Maximum likelihood method). Количество анализируемых последовательностей ДНК-штрихкодов по исследуемым маркерам и результаты их статистического анализа представлены в таблице.

Исследуемый маркер	<i>ITS1.1</i>	<i>ITS1.2</i>	<i>ITS2</i>
Количество исследуемых штрихкодов	18	6	34
Количество анализируемых видов	3	2	6
Длина маркера (п.н.)	≈200	≈240	≈269
Среднее значение внутривидовой дистанции	0,0221	0,1554	0,00307
Среднее значение межвидовой дистанции	0,0843	0,192	0,05797
Количество гаплотипов	3	3	8
Видодифференцирующие гаплотипы	2	3	7
Кол-во видов, дифференцирующихся со 100% вероятностью	1	2	4
Однозначная идентификация (%)	11,11	100	32,35
Неоднозначная идентификация (%)	88,88	0	67,65

Результаты и обсуждение. Анализируя полученные результаты статистической обработки нуклеотидных последовательностей по маркеру ДНК-штрихкодирования *ITS2* было установлено, что отношение среднего значения межвидовой дистанции к среднему значению внутривидовой дистанции составило 18,88, что является значимым отличием.

Т.е. потенциал к дифференциации видов у *ITS2* относительно высокий. С помощью данного маркера было установлено 7 уникальных гаплотипов характерных для определенных видов, с помощью которых успешно были разделены *Pinus nigra*, *Pinus rigida*, *Pinus strobus*, *Pinus cembra*. Еще один гаплотип был характерен для двух видов (*Pinus mugo* и *Pinus sylvestris*), что отрицательно отразилось на возможности дифференциации с использованием данного маркера. С учетом того, что *Pinus mugo* и *Pinus sylvestris* были представлены значительным количеством нуклеотидных последовательностей, однозначная идентификация видов снизилась для маркера *ITS2* до 32,35%. Короткая нуклеотидная последовательность данного маркера для рода *Pinus* (≈269 п.н.) является неоспоримым преимуществом для судебной экспертизы, поскольку позволит исследовать деградированные объекты с малым количеством биологического материала.

При выполнении локального выравнивания последовательностей рода *Pinus* по маркеру *ITS1* было выявлено два кластера, которые между собой имели крайне низкую степень покрытия. Но при разделении образцов на две группы выравнивание происходило успешно. По этой причине образцы для маркера *ITS1*, разделенные на две группы, статистически обрабатывались отдельно. Наличие двух сильно отличающихся нуклеотидных последовательностей *ITS1* региона может усложнить подбор праймеров или привести к неспецифическому отжигу праймеров, что в конечном итоге усложнит анализ полученных результа-

тов либо приведет к их полному отсутствию. Данная проблема косвенно подтверждается небольшим количеством ДНК-штрихкодов для рода *Pinus* по данному ДНК-штрихкоду в NSBI, а также отсутствием полных последовательностей *ITS1* длинного типа. Аналогичные случаи для отдельных видов описаны в литературе, так для *Pinus pinea* описана принадлежность *ITS1* к различным генам рибосомального РНК, которые отличаются по длине (2631 и 271 п.н.) и не имеют заметной гомологии по нуклеотидному составу [1]. Дополнительно проведенный анализ 69 видов *Pinus* выявил, что данная проблема характерна для всего рода в целом.

При поиске последовательностей исследуемых видов в базе данных NSBI, по маркерам *ITS1* и *ITS2* отсутствовали последовательности для вида *Pinus banksiana*, который был исключен из исследования.

Выводы. ДНК-штрихкод *ITS2* пригоден для дифференциации четырех видов представителей рода *Pinus* (*Pinus nigra*, *Pinus rigida*, *Pinus strobus*, *Pinus cembra*), произрастающих на территории Республики Беларусь. Небольшое количество нуклеотидных последовательностей *ITS2* в базе данных NSBI, возможно связано с техническими сложностями, характерными для маркера *ITS1*.

Использование маркера *ITS1* не рекомендуется для проведения исследований в судебной экспертизе из-за наличия описанных выше проблем, которые могут привести к ложно отрицательному результату.

Литература:

1. Marrocco, R. Nucleotide sequence of the internal transcribed spacers and 5.8s region of ribosomal DNA in *Pinus pinea* L. / R. Marrocco, M.T. Gelati, F. Maggini // DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping. — 1996. — Vol. 6. — P.75-77.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант № Б22М-068 от 04.05.2022.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ И ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ РОДА РАСТЕНИЙ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ ИНТЕРЕС В ПРИКЛАДНОЙ И СУДЕБНОЙ ПАЛИНОЛОГИИ

Верчук А.Н.^{1,2}, Кильчевский А.В.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

² Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь

Введение. Растущий интерес к палинологии и потенциал ее применения делает пыльцевые зерна актуальным объектом исследования. Однако одновременно всё видовое многообразие пыльцы изучить и создать новый, универсальный инструмент для исследователя не представляется возможным, поскольку насчитывается более чем 400 тысяч видов растений, которые в той или иной степени способны к пылению. По этой причине необходимо выбрать наиболее распространенные, хозяйственно важные рода растений, которые создают фон «пыльцевого следа» что и является целью проводимой работы.

Материалы и методы. Поскольку традиционная палинология успешно дифференцирует представителей на более высоких таксономических уровнях (семейство, порядки), но обладает низким таксономическим разрешением из-за морфологически одинакового строения внешней оболочки пыльцы для некоторых родов и видов растений [1], то возникает необходимость дифференциации пыльцы до вида. Изучение всех видов одного таксона актуально, поскольку на исследование может поступить объект из любого региона планеты либо иметь следы, оставленные в ходе его транспортировки. Например, в случаях при завозе санкционной продукции, которая может поступать через третьи страны или при незаконном перемещении наркотических средств.

Морфологическая идентичность поверхности пыльцевого зерна снижает достоверность полученных результатов, решение проблемы определения вида пыльцы качественно отразится на основных показателях методов споро-пыльцевого анализа. Поэтому необходимо в первую очередь обратить внимание на таксоны, морфологически трудно дифференцируемые при изучении с помощью молекулярно-биологического инструмента — ДНК-штрихкодирования. Дополнительными критериями в выборе первоочередных таксонов исследования могут служить показатели распространённости рода и его способность к обильному пылению. К таким родам можно отнести: род сосна (*Pinus*), к которому, по данным сайта The Plant List (<http://www.theplantlist.org/>), относятся около 130 видов, род ель (*Picea*) — 40 видов, и род береза (*Betula*) — 119 видов и гибридов. Данные виды, как основные лесообразующие древесные растения на территории Республики Беларусь, занимают, по данным Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь, 54,8%, 11% и 18,8% лесной площади соответственно. В Российской Федерации ситуация схожа — по данным Министерства природных ресурсов и экологии Российской Федерации сосна (*Pinus*), ель (*Picea*) и береза (*Betula*) занимали в 2020 году

15,4%, 10% и 15,5% соответственно, однако основным лесообразующим родом является лиственница (*Larix*) с 35,5% территории от земель лесного фонда. Тем самым данные растения представляют большой интерес и хозяйственное значение в экономике Союзного государства и в значительной степени влияют на экологическую ситуацию двух стран.

Выводы. Таким образом, решение задачи дифференциации пыльцы с помощью молекулярно-генетического метода — ДНК-штрихкодирования, является актуальным и востребованным. Но для успешного его применения необходимо подробное исследование каждого вида, его генетических и морфологических отличий. Поскольку, сложности могут возникать на любом этапе исследования, включая выделение ДНК [2], из-за строения пыльцевой стенки, которая образована воскоподобным биополимером спорополленином, устойчивым как к воздействию кислот и щелочей, так и к нагреванию до 200 °С. Нами предполагается углубленное исследование семейств березовые (*Betulaceae*) и сосновые (*Pinaceae*) с помощью как ядерных маркеров (таких как *ITS* и *ITS2*) штрихкодирования, так и пластидных (*rbcl*, *psbA-trnH*, *matK* и другие). Ранее для данных родов были получены последовательности сиквенсов по данным маркерам. Так же с целью изучения собрана и пополняется коллекция образцов гаплоидной (пыльца) и диплоидной (листья) ткани, которая включает в себя 217 и 123 образца от семейств березовые (*Betulaceae*) и сосновые (*Pinaceae*) соответственно, в том числе род береза (*Betula*) 92 образца, род сосна (*Pinus*) 60 образцов, род ель (*Picea*) 54 образца и 12 образцов лиственницы (*Larix*).

Данная работа выполняется при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант № B22M-068.

Литература:

1) Анохин, Ю.В. Судебная ботаническая экспертиза: исследуемые объекты растительного происхождения и решаемые задачи / Ю.В. Анохин, Е.А. Мунгалов // Юристы-Правоведы: Криминалистика и оперативно-розыскная деятельность; судебно-экспертная деятельность. — 2021. — Т.96, № 1 — С.184 — 191.

2) Верчук, А.Н. Сравнительное изучение методов предобработки пыльцы растений для получения качественных образцов ДНК / А.Н. Верчук, С.В. Кубрак, А.В. Кильчевский // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2022. — Т. 33. — С. 58 — 66.

ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ СУДЕБНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

Верчук А.Н.^{1,2}

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

² Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь

Введение. Успешное исследование, связанное с изучением биологических объектов, напрямую зависит от доступности коллекционного материала, где изучаемые объекты представлены максимально разнообразно. Различные объекты растительного происхождения присутствуют в судебно-экспертных исследованиях: при проведении палинологической экспертизы, экспертизы изделий из растительного сырья, произведений искусства, продуктов питания, фармацевтического сырья и т.д. Решение этих задач невозможно без использования эталонных коллекций, позволяющих максимально точно идентифицировать растительные объекты.

Благодаря развитию молекулярной биологии, появляются новые инструменты по дифференциации видового состава объектов растительного происхождения, которые могут применяться в судебной экспертизе (например, в классической палинологии) — ДНК-штрихкоды. Они могут эффективно дополнить или заменить традиционные методы изучения растительных объектов, в том числе и пыльцы. Практически все виды растений потенциально представляют интерес для судебной экспертизы, а методологически подходы по исследованию интересующего вида не могут быть разработаны без молекулярно-биологического исследования его представителей.

Цель работы — формирование коллекции биологического материала растительного происхождения пригодной для сравнительных исследований при проведении молекулярно-генетических исследований в области судебной биологической экспертизы.

Материалы и методы. Формирование коллекции биологического материала осуществляется исходя из распространенности, хозяйственной важности и доступности растений, произрастающих на территории Республики Беларусь как в природных, так и в искусственно созданных экосистемах. Ценность коллекции напрямую зависит от полноты информации, которая характеризует образцы, поэтому на основе анализа мирового опыта был сформирован перечень обязательной информации, которая заполняется непосредственно при сборе образца: географические данные (область, район, GPS-координаты), сделанные минимум с трех ракурсов фотографии,

предполагаемый вид растения, календарная дата сбора образца и т.д.

В настоящее время основная информация по материалам, собранным в коллекцию, оформлена в виде компьютерной базы данных (БД), что позволяет эффективно накапливать, обрабатывать и хранить текстовую информацию. БД представлена в виде таблицы формата MS Excel. Фотографии с мест сбора образцов и полученные при исследовании последовательности ДНК-штрихкодов хранятся отдельно, но информация о наличии также отражается в БД.

Учетной единицей коллекции является образец, представленный пыльцой, который продублирован дополнительно тканью листовой пластинки. Образцу присваивается порядковый номер сплошной нумерации БД. Все образцы пыльцы хранятся в специальных криопробирках с возможностью глубокой заморозки; образцы листовых пластинок после сушки хранятся в виде гербарного материала.

Выводы. Формирование коллекции биологического материала растительного происхождения пригодной для сравнительных исследований при проведении молекулярно-генетических исследований в области судебной биологической экспертизы крайне важная задача. Доступность биологического материала при проведении сравнительного исследования, от различных тканей одного растения, поможет оценить сопоставимость полученных результатов при изучении различных объектов растительного происхождения. Благодаря развитию молекулярно-генетических методов исследования по дифференциации видового состава объектов растительного происхождения, которые применяются в судебной экспертизе будет возможно эффективно дополнить или заменить традиционные методы изучения растительных объектов.

В результате проведенных работ сформирована коллекция, включающая более 800 биологических образцов представителей 80 видов из 57 родов, 26 семейств. С использованием коллекционных образцов получено более 400 ДНК-штрихкодов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант № Б22М-068 от 04.05.2022.

Раздел 10. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ГЕНЕТИКЕ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

МУТАЦИИ ГЕНА *FGD1* (FACIOGENITAL DYSPLASIA) ЗАМЕДЛЯЮТ ПОСТ ГОЛЬДЖИ ТРАНСПОРТ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОТЕИНОВ И РЕГУЛИРУЮТ ДИНАМИКУ МИКРОТРУБОЧЕК

Егоров М.В., Полищук Р.С.

Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Via Campi Flegrei, 34, 80078 — Pozzuoli (NA), ITALY

Введение. Синдром Аарскога–Скотта (ACC, #OMIM305400) является орфанной X-сцепленной генетической болезнью. Вероятная частота встречаемости ACC в среднем составляет 1:25000. Основными клиническими проявлениями ACC являются диспропорциональный низкий рост, за счет нарушения развития длинных трубчатых и плоских костей скелета, пороки развития лицевого черепа и задержка умственного развития (1). *FGD1* ген кодирует одноименный белок (961aa), состоящий из 5 участков (PRD, DH/PH модуль, FYVE, PH2) и является специфическим фактором активатором для Rho GTPase Cdc42 относящаяся к суперсемейству RAS. Мутации *FGD1* гена (loss of function) приводят к нарушению активности G-протеина, Cdc42 (2). В свою очередь Cdc42 является регулятором цитоскелета, мембранного транспорта и клеточной дифференцировки. Однако роль *FGD1* как специфического регулятора Cdc42 в этих процессах и патогенезе ACC остается непонятной.

Целью нашей работы была детальная характеристика роли *FGD1* протеина в регуляции внутриклеточного транспорта секреторных протеинов.

Материал и методы. Для определения роли *FGD1* протеина в транспорте секреторных белков к плазматической мембране, были использованы клетки линии HeLa (CCL-2™, USA), которые выращивались *in vitro* в питательной среде DMEM, с содержанием 10% эмбриональной телячьей сыворотки. На 3 день после трансфекции дуплексами siRNA против человеческого гена *FGD1*, HeLa клетки инфицировались VSV (ts-045, вирус везикулярного стоматита) и подвергались протоколу пульсовой волны. Эффективность ингибирования *FGD1* гена составляла до 95% от уровня контрольных клеток и оценивалась с помощью метода Western blotting. Протокол пульсовой волны позволяет отслеживать динамику транспорта секреторного люминального VSVG (гликопротеин G вируса везикулярного стоматита) к плазматической мембране. Для деполимеризации микротрубочек использовался нокадазол (Sigma, USA) в концентрации 33 μM (3 часа при +37°C) в бессывороточной среде, клетки фиксировались через 3 минуты, что позволило оценить начало восстановления микротрубочек растущих от отдельных элементов Гольджи комплекса.

Основные результаты. В серии проведенных экспериментов в контрольных и клетках трансфектированных siRNA *FGD1* VSVG протеин ко-локализовался с TGN46, что подтверждает отсутствие влияния *FGD1* на

транспорт специфических протеинов в сегменте от эндоплазматического ретикулума до аппарата Гольджи (АГ) и транспорт протеинов в пределах аппарата Гольджи. Последовательный нагрев питательной среды до +32°C стимулировал формирование транспортных переносчиков в контрольных клетках и их эффективный транспорт до плазматической мембраны. При этом в условиях ингибирования *FGD1* гена специфическими siRNA отмечалась существенная задержка выхода VSVG из АГ. Накопление VSVG в терминальном сегменте АГ при ингибирования *FGD1* гена подтверждено его ко-локализацией с маркером транс-сети АГ TGN46. Количественная характеристика задержки транспорта оценивалась в сходных экспериментальных условиях с применением таниновой кислоты. Морфометрический анализ подсчета транспортных переносчиков содержащих VSVG показал достоверное снижение пост-Гольджи транспорта в условиях ингибирования *FGD1* гена на 60–70% в сравнении с контрольными клетками.

Одним из ведущих компонентов в формировании и транспорте мембранных переносчиков от комплекса Гольджи к плазматической мембране являются микротрубочки (МТ). Недавние исследования показали, что существенная часть (около 40%) МТ формируется от элементов АГ. В предыдущих исследованиях нами было высказано предположение о том, что задержка транспорта протеинов от АГ в условиях клеточного моделирования ААС может быть обусловлено нарушением взаимодействия между формирующимся транспортным домейном и МТ. Что бы понять роль *FGD1* в регуляции динамики МТ растущих от Гольджи, мы использовали метод, основанный на восстановлении МТ после их деполимеризации вызванной нокадазолом. В контрольных клетках отмечалось формирование новообразованных МТ растущих от отдельных Гольджи элементов по типу “звезд”. В отличие от контрольных клеток, мы отмечали существенную задержку восстановления МТ в условиях клеточного моделирование ААС. При этом отмечалось нарушение нуклеации и роста МТ от Гольджи. Существенное замедление восстановления МТ говорит о важной роли *FGD1* в регуляции динамики МТ растущих от АГ, и позволяет объяснить замедление транспорта мембранных переносчиков. По-видимому, нарушение регуляторной функции *FGD1* на мембранах комплекса Гольджи приводит к дискоординации между формирующимися

мембранными переносчиками и локальным пулом МТ растущих от мембран комплекса Гольджи.

Заключение:

1. Полученные нами экспериментальные данные показывают роль сигнальной системы регулируемой *FGD1* в транспорте секреторных протеинов. Дефицит *FGD1* протеина замедляет транспорт секреторных протеинов к поверхности клетки.

2. Замедление транспорта секреторного VSVG и его накопление на уровне комплекса Гольджи позволяет объяснить нарушение секреции и возможно, замедление роста костей пациентов носителей Аарског-Скотт синдрома.

3. Отмечено замедление восстановления (полимеризации) микротрубочек от Гольджи элементов при ААС, что может приводить к нарушению взаимодействия

транспортных переносчиков и микротрубочек. Дальнейшие исследования будут направлены на детализацию сигнального пути контролируемого *FGD1* и закладывает основы для расшифровки молекулярного механизма патогенеза ААС.

Литература

1. Aarskog D. A familial syndrome of short stature associated with facial dysplasia and genital anomalies. // *J. Pediat.* — Vol. 77. — № 5 — 1971. — P. 856–861.

2. Estrada L., Caron E., Gorski J. *Fgd1*, the Cdc42 guanine nucleotide exchange factor responsible for faciogenital dysplasia, is localized to the subcortical actin cytoskeleton and Golgi membrane. // *Hum. Mol. Gen.* — V. 10. — № 5. — 2001. — P. 485–495.

СОЧЕТАНИЕ МУТАЦИЙ, ПРИВОДЯЩИХ К ПРЕЖДЕВРЕМЕННОМУ СТОП-КОДОНУ В ГЕНЕ *TTN*, И МИССЕНС-МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *RYR2* У ПАЦИЕНТОВ С НЕКОМПАКТНЫМ МИОКАРДОМ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА

Чакова Н.Н.¹, Комиссарова С.М.², Ниязова С.С.¹, Долматович Т.В.¹, Ринейская Н.М.²

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Беларусь

Актуальность. Укорачивающие титин мутации (*TTNtv*) являются наиболее распространенной генетической причиной (15–25% случаев) некомпактного миокарда левого желудочка (НМЛЖ), а мутации в гене *RYR2* — катехоламинергической полиморфной желудочковой тахикардии. Также известны случаи обнаружения мутаций в гене *RYR2* и у пациентов с НМЛЖ. На данный момент отсутствуют случаи клинического описания пациентов с сочетанием мутаций в этих двух генах.

Цель работы. Оценить частоту встречаемости и генотип-фенотипические характеристики сочетанного наследования укорачивающих белок нуклеотидных вариантов в гене *TTN* и мутаций в гене *RYR2* у пациентов с НМЛЖ.

Материалы и методы. В исследование включен 51 неродственный пациент с НМЛЖ (изолированный НМЛЖ и в сочетании с дилатационной или гипертрофической кардиомиопатиями). Медиана возраста пациен-

тов — 42 [18; 69] года, преобладали мужчины (77,8%). Диагноз НМЛЖ устанавливался на основании следующих критериев: 1) ЭхоКГ критериев Jenni; 2) МРТ-критериев S. Petersen и A. Jaquier. Методом NGS проведен поиск мутаций в экзонах 174 генов, ассоциированных с сердечно-сосудистой патологией, на приборе Illumina MiSeq («Illumina Inc.», США) с использованием набора реагентов «TruSight™ Cardio Sequencing Panel» («Illumina Inc.», США).

Результаты. У 9 (17,6%) пациентов с НМЛЖ (м/ж — 7/2) выявлены мутации в гене *TTN*, приводящие к возникновению преждевременного стоп-кодона: 7 нонсенс-мутаций (p.Glu4095*, p.Gln4566*, p.Gly15531*, p.Arg16766*, p.Gly17830*, p.Trp24578*, p.Tyr25971*) и 2 делеции, вызывающие сдвиг рамки считывания с последующим образованием преждевременного стоп-кодона (p.Arg19172Gluufs*10 и p.Ala29853Leufs*8).

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА *TTNtv* И МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *RYR2* В ГРУППЕ ПАЦИЕНТОВ С НКМ

Код	Пол, возраста	<i>TTN</i>		<i>RYR2</i>	
		Замена в ДНК (экзон)	Замена в белке, rs	Замена в ДНК (экзон)	Замена в белке, rs
570с	ж, 45	c.13696C>T (48)	p.Gln4566*, rs775072385	c.12944G>A (90)	p.Gly4315Glu, rs766109950
583с	ж, 52	c.46591G>T (250)	p.Gly15531*	—	—
557с	м, 40	c.50296C>T (267)	p.Arg16766*, rs754866489	—	—
593с	м, 51	c.53488G>T (278)	p.Gly17830*, rs759231562	—	—

560с	м, 29	c.57514delA (294)	p.Arg19172Glufs*10	—	
579с	м, 22	c.73734G>A (326)	p.Trp24578*	—	
690с	м, 40	c.77913T>G (326)	p.Tyr25971* , rs72648203	—	
765с	м, 43	c.89553del (335)	p.Ala29853Leufs*8, rs561557554	c.12944G>A (90)	p.Gly4315Glu, rs766109950

Примечание: м — мужской пол, ж — женский пол; а — возраст манифестации; жирный шрифт — новая, ранее не описанная мутация

У 3 из этих пациентов мутации *TTNtv* сочетались с дополнительным вариантом неопределенной значимости (VUS) в гене *RYR2*, кодирующим рианодинорный рецептор 2-го типа: у 1 пациента с нонсенс-мутацией p.Glu4095* обнаружена делеция p.Lys4223del (rs794728838) в гене *RYR2*; у 2 пациентов с *TTNtv* p.Gln4566* и p.Ala29853Leufs*8 — замена p.Gly4315Glu (rs766109950) в гене *RYR2*. Шестидесятилетнему пациенту с делецией p.Lys4223del в гене *RYR2* и внезапно развившейся устойчивой желудочковой тахикардией (ЖТ) был имплантирован ИКД. У двух пациентов с миссенс-мутацией c.12944G>A (p.Gly4315Glu) в гене *RYR2* зарегистрированы частые эпизоды неустойчивой ЖТ, купируемые антиаритмической терапией. У всех

пациентов с двумя генетическими вариантами наблюдалась умеренная дисфункция левого желудочка (снижение ФВ ЛЖ<50%), у пациента с вариантом *TTNtv* p.Glu4095* и делецией p.Lys4223del в гене *RYR2* — выраженная дилатация полости ЛЖ (ИКДО 126 мл/м²).

Выводы. У 3 из 9 пациентов с НМЛЖ, имеющих укорачивающие титин мутации, выявлены замены в 90 экзоне гена *RYR2*, что ассоциировалось с аритмическим фенотипом НМЛЖ. Наличие сочетания вариантов *TTNtv* с заменами в гене *RYR2* может являться генетическим маркером развития жизнеугрожающих нарушений ритма у пациентов с НМЛЖ. Выявленный феномен нуждается в расширенном изучении.

СПЕКТР МУТАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С АРИТМОГЕННОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

Чакова Н.Н.¹, Комиссарова С.М.², Долматович Т.В.¹, Ниязова С.С.¹, Ефимова А.А.²

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Беларусь

Введение. В настоящее время фенотипический спектр аритмогенной кардиомиопатии (АК) расширен и включает правожелудочковый и бивентрикулярный варианты, требующие ранней диагностики для стратификации риска жизнеугрожающих аритмий.

Цель. Определить спектр и распространенность мутаций у пациентов с АК и провести сравнительный анализ генетических вариантов между различными типами АК.

Материалы и методы. В исследование включены 20 неродственных пробандов с АК (10м/10ж, медиана возраста 35 [21;67] лет). Диагноз АК установлен согласно критериям, разработанным междисциплинарной рабочей группой международных экспертов Университета Падуи, 2020. Кли-

ническое обследование включало ЭКГ покоя, 24-ч СМ ЭКГ, ЭхоКГ, МРТ сердца с контрастным усилением. У 9 (45,0%, 7м/2ж) из 20 пациентов диагностировали бивентрикулярный тип АК, у остальных (3м/8ж) — аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка (АКПЖ). Всем пациентам методом NGS проводили генотипирование 174 генов, ассоциированных с наследственной патологией сердечно-сосудистой системы. Патогенность выявленных генетических вариантов была оценена согласно критериям Американской коллегии медицинской генетики и геномики, 2015.

Результаты. Результаты генотипирования пациентов с АКПЖ и бивентрикулярным вариантом АК представлены в таблице.

ТАБЛИЦА. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫЯВЛЕННЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С АК

Шифр	Пол, возраст	Ген	Эк-зон	Нуклеотидная замена, Rs	Аминокислотная замена	Класс мутации, MAF (gnomAD)
Бивентрикулярный тип АК						
17м	м, 32	<i>PKP2</i>	5	c.1237C>T, rs372827156	p.Arg413*	P (0.000014)
18м	м, 45	<i>PKP2</i>	9	c.1912C>T, rs397517012	p.Gln638*	P (0.000007)

793с	м, 26	<i>PKP2</i>	11	c.2014-1G>C, rs193922674	-	P (0.000032)
707с	м, 35	<i>PKP2</i>	4	c.1057_1058del	p.Leu353Glyfs*33	* (0.00)
		<i>DSP</i>	24	c.6014C>T, rs749925817	p.Ala2005Val	VUS (0.000007)
778с	ж, 45	<i>DSP</i>	23	c.5212C>T/ rs794728124	p.Arg1738*	P (0.000032)
798с	м, 36	<i>DSG2</i>	3	c.137G>A, rs121913008	p.Arg46Gln	P/LP (0.000004)
801с	ж, 33	<i>DSC2</i>	5	c.488C>A, rs758759298	p.Thr163Lys	VUS (0.00)
6м	м, 24	<i>DSP</i>	23	c.3494delA	p.Lys1165Argfs*10	* (0.00)
		<i>DSC2</i>	5	c.601G>A,rs202058544	p.Val201Ile	VUS (0.000012)
4 м	м, 32	<i>DSP</i>	3	c.364G>T	p.Asp122Tyr	** (0.00)
		<i>DSC2</i>	4	c.394C>T rs727504578	p.Arg132Cys, гомозигота	VUS (0.000035)
АКПЖ						
787с	м, 49	<i>PKP2</i>	7	c.1523_1538del	p.Asn508Thrfs*7	LP (0.00)
810с	ж, 21	<i>PKP2</i>	4	c.1057_1058del	p.Leu353Glyfs*33	** (0.00)
		<i>PKP2</i>	9	c.1951C>T, rs199583774	p.Arg651Cys	VUS (0.000127)
781с	м, 29	<i>PKP2</i>	3	c.971_972insT	p.Ala325Glyfs*11	P (0.00)
		<i>PKP2</i>	13	c.2504T>C rs775572104	p.Leu835Pro	VUS (0.000016)

Примечание: м — мужской пол, ж — женский пол; P — патогенный вариант (V класс патогенности); LP — вероятно патогенный вариант (IV класс); VUS — вариант с неизвестной клинической значимостью (III класс); * — обозначение стоп-кодона; ** — новый вариант, патогенный по предикторам in silico

У 12 (60,0%) из 20 пациентов выявлено 17 мутаций в генах, ассоциированных с различными типами АК: 9 вариантов находились в гене *PKP2*, 4 — в гене *DSP*, 3 — в гене *DSC2* и 1 — в гене *DSG2*. 7 (41,2%) из 16 вариантов были патогенными или вероятно патогенными мутациями, 4 — новыми и 6 — вариантами с неизвестной клинической значимостью — VUS (таблица). Все варианты были уникальными за исключением мутации p.Leu353Glyfs*33 в гене *PKP2*, выявленной у двух пациентов (№707с, №810с). У 4 (44,4%) из 9 пациентов с бивентрикулярным вариантом АК обнаружены 4 мутации (2 нонсенс-мутации, 1 делеция с образованием преждевременного стоп-кодона и мутация сайта сплайсинга) в гене *PKP2*: p.Arg413*; p.Gln638*; p.Leu353GlyfsTer33 и c.2014-1G>C. В этом же гене обнаружены 5 мутаций (делеция и инсерция с образованием преждевременного стоп-кодона и 3 миссенс-мутации) у 3 (27,3%) из 11 пациентов с АКПЖ: №810с — p.Leu353GlyfsTer33 и p.Arg651Cys; №781с — p.Ala325GlyfsTer11 и p.Leu879Pro; №787 — p.Asn508Thrfs*7. Следует отметить, что новая делеция со сдвигом рамки считывания p.Leu353GlyfsTer33 в гене *PKP2* была выявлена у пациентов с различными фенотипами АК, при этом в обоих случаях был выявлен дополнительный вариант VUS: у №810с с АКПЖ в этом же гене; у №707с с бивентрикулярным типом АК в гене *DSP*. Варианты в гене *DSP* (p.Arg1738*; p.Lys1165Argfs*10; p.Asp122Tyr и p.Ala2005Val),

DSC2 (p.Thr163Lys; p.Val201Ile; p.Arg132Cys в гомозиготе) и *DSG2* (p.Arg46Gln) обнаружены только у пациентов с бивентрикулярной АК, при этом у 3 пациентов из них выявлено сочетание нескольких вариантов: в генах *DSP* и *DSC2* (2 пациента); *DSP* и *PKP2* (1 пациент). У 1 пациента с АКПЖ выявлен новый, патогенный по предикторам in silico, вариант с.763G>T (p.Val255Phe) в гене *SCN5A*, ассоциированном преимущественно с каналопатиями (не представлен в таблице). У 7 (63,6%) из 11 пациентов с АКПЖ мутаций не обнаружено.

Заключение. У 12 (60,0%) из 20 пациентов выявлено 17 мутаций в генах, ассоциированных с АК (*PKP2*, *DSP*, *DSC2* и *DSG2*). Все нуклеотидные изменения были уникальными за исключением новой мутации p.Leu353Glyfs*33 в гене *PKP2*. Патогенные варианты в генах, ассоциированных с АК, обнаружены у 8 (88,9%) из 9 пациентов с бивентрикулярным вариантом АК и у 3 (27,3%) из 11 пациентов с АКПЖ. У 5 (41,7%) из 12 пациентов с выявленными мутациями наблюдалось несколько генетических вариантов. Мутации в гене *PKP2* встречались у 44,4% пациентов с бивентрикулярной АК, что было в 1,6 раз чаще, чем у пациентов с АКПЖ (27,3%). Варианты в других генах (*DSP*, *DSC2* и *DSG2*) выявлены только у пациентов с бивентрикулярной АК. У 1 пациента с вероятной АКПЖ выявлен новый вариант в гене *SCN5A*, ассоциированном большей частью с каналопатиями.

НОВЫЕ ПАТОГЕННЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА БЕТА-ГЛОБИНА У ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ ИЗ РОССИИ И БЛИЖНЕГО ЗАРУБЕЖЬЯ

Селиванова Д. С., Щемелева Е. Ю., Саломашкина В. В., Сурин В. Л.

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Актуальность. Гемоглобин — один из наиболее хорошо изученных белков человека. Нарушения в структуре гемоглобина, обусловленные мутациями в генах, кодирующих его субъединицы, также давно известны и хорошо изучены. Гемоглобинопатии являются наиболее часто встречающимися моногенными наследственными заболеваниями в мире. Самым широко известным вариантом аномалий генов глобинового кластера является серповидноклеточная анемия (HbS), возникающая вследствие миссенс-мутации в шестом кодоне гена бета-глобина (*HBB*, MIM 141900). Ген *HBB* имеет небольшую длину, 1608 п.н., состоит из трёх экзонов, кодирующих 146 аминокислот. При таких небольших размерах гена известно более 900 его патогенных вариантов, порядка 600 из которых ассоциированы с аномальными гемоглобинами, и 350 относятся к мутациям, обуславливающим бета-талассемию. При этом отмечается широкое фенотипическое разнообразие бета-талассемий, которое отражает гетерогенность мутаций в локусе *HBB*.

Хотя Россия не является регионом, эндемичным по различным гемоглобинопатиям, многонациональный состав населения и постоянные миграционные потоки способствуют тому, что в нашей стране пациенты с нарушениями генов глобинового кластера встречаются постоянно и их число растёт. Неоднократно были опубликованы спектры патогенных вариантов как непосредственно гена бета-глобина, так и нескольких генов глобиновых кластеров для пациентов из России или отдельных ее регионов. Однако, несмотря на длинную историю изучения и диагностики дефектов бета-глобина, а также постоянную рутинную практику установления мутаций в гене *HBB*, всё еще выявляются новые, не описанные ранее в мировой научной литературе патогенные варианты этого локуса.

Целью данной работы было описание новых для России генетических вариантов локуса *HBB*, два из которых не описаны в литературе и международных базах данных.

Материалы и методы. В период с октября 2021 г. по август 2023 г. в лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России был проведен молекулярно-генетический анализ 200 пациентам с подозрениями на гемоглобинопатии, связанные с мутациями в гене бета-глобина. Материалом для экстракции ДНК служила периферическая кровь. Для поиска мутаций использован метод секвенирования по Сэнгеру всех экзонов, интронов, зон сплайсинга, а также промоторной области и сигнала полиаденилирования гена *HBB*. Для выявления крупных делеций применяли метод гэл-ПЦР. Для обозначения генетических вариантов мы использовали HGVS номенклатуру, в скобках дана исторически принятая для гена *HBB* номенклатура, при которой нумерация кодонов начинается после иницирующего кодона, обозначающегося как «Start» или «0», в тексте номера аминокислот и кодонов также даны по исторической номенклатуре.

Результаты. У 130 пациентов было выявлено 139 аллелей гена *HBB*, несущих патогенные нарушения, представляющие собой точечные нуклеотидные замены или мелкие делеции и инсерции. У одного пациента определена гомозиготная Сицилийская ($\delta\beta$)0-мутация, представляющей собой делецию 13,4 т.п.н., включая полностью ген бета-глобина (*HBB*) и частично ген дельта-глобина (*HBD*).

Всего было выявлено 32 различных варианта, 6 из них ассоциированы с аномальными гемоглобинами, остальные 26 приводят к бета-талассемии.

Отметим, что 6 патогенных вариантов не были встречены ранее среди российских пациентов. Четыре из них известны в мировой популяции, это: с.-29 G>A (CAP +22 [G>A]), с.1A>G (CD 0 [ATG>GTG]), с.153del (CD 50 [-T]) и с.316-2A>C (IVSII +849 [A>C]). Данные мутации были выявлены в гетерозиготном состоянии у четверых пациентов-резидентов России. Кроме того, еще у двоих пациентов идентифицированы варианты, не описанные в доступных источниках литературы и базах данных. Это мутации с.173del (CD57 [-A]) и с.368del (CD122 [-T]). Оба варианта представляют собой точечные микроделеции одного нуклеотида во втором и третьем экзонах, соответственно, что приводит к сдвигу рамки считывания.

В варианте с.173del сдвиг рамки считывания ведет к образованию стоп-кодона и обрыву полипептидной цепи уже в кодоне 60. Поскольку известен близкий патогенный вариант с.176del, в результате которого также образуется терминирующий кодон TGA в кодоне 60, новая микроделеция, по всей видимости, аналогично должна трактоваться как бета(0)-талассемическая мутация. Пациентка-носительница этого патогенного варианта является жительницей европейской части России.

При другой новой микроделеции с.368del из-за сдвига рамки считывания формируется новый стоп-кодон TAA в кодоне 157. Таким образом, полипептидная цепь, наоборот, удлиняется по сравнению с нормальной, содержащей 146 аминокислот. Новая видоизменная последовательность этой цепи практически гомологична известным вариантам с.370del (CD 123 [-A]), Hb Makabe, и с.363del (CD 120 [-A]), Hb Filottrano, при которых терминирующий кодон также образуется в кодоне 157, что приводит к формированию химерного C-хвоста полипептидной цепи. При этом оба варианта бета-цепей являются крайне нестабильными, поэтому при стандартных методах анализа, таких как электрофорез гемоглобинов, данные аномальные гемоглобины не идентифицируются. При новом варианте с.368del, выявленном в данной работе, полипептидная последовательность отличается от таковых Hb Makabe и Hb Filottrano на одну аминокислотную замену, в положении 122 и 121, соответственно. Таким образом можно смело предположить, что вариант с.368del приводит к формированию нового гипернестабильного гемоглобина.

Пациент — носитель варианта с.368del происходит из горного района Таджикистана и с раннего детства страдает анемией. К сожалению, для этого пациента не представляется возможным установление природы мутации, является ли она унаследованной от одного из родителей или возникла de novo.

Интересно отметить, что за предыдущие 30 лет исследования глобиновых генов в нашей лаборатории среди 750 пациентов было выявлено всего 5 новых вариантов, три аномальных гемоглобина и две бета-талассемические мутации. Примечательно, что один из трех вновь описанных ранее аномальных гемоглобинов, Hb Ryazan, также образуется путем микроделеции одного нуклеотида в

третьем экзоне (кодон 132) и сдвига рамки считывания, приводящего к удлинению полипептидной цепи до 156 аминокислот и её нестабильности

Заключение. Оба новых варианта гена *HBB* представляют большой интерес. Выявление нового варианта с.173del в довольно хорошо изученном европейском регионе демонстрирует, что разнообразие спектра мутаций локуса *HBB* все еще не вышло на плато и обнаружение новых вариантов остается вероятным по мере увеличения выборки пациентов. Среднеазиатский же регион является «белым пятном» на мировой карте спектров нарушений глобиновых генов. Поэтому данные о новом патогенном варианте с.368del из этой местности особенно актуальны.

АНАЛИЗ ВСТРЕЧАЕМОСТИ НОСИТЕЛЬСТВА ЧАСТЫХ АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, КАК ОБОСНОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА ДОНОРОВ ГАМЕТ В ВРТ

Щелочков А.М.^{1,2}, Рящина А.Н.¹

¹ АО «Медицинская компания ИДК», ГК «Мать и дитя», Самара, Россия.

² ФГБОУ Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия.

Введение. Аутосомно-рецессивные заболевания в практике работы центров репродукции составляют отдельную проблему при применении донорских гамет в программах ВРТ (вспомогательных репродуктивных технологий). Когда в семье, вынужденной прибегнуть к донорской программе, рождается больной ребенок, это отягощает моральное состояние пациентов, после длительного обследования и лечения (чаще всего не однократного) ожидающих благоприятный исход в виде рождения здорового ребенка.

Среди большого числа аутосомно-рецессивных заболеваний выделяется группа наиболее распространенных. К таким заболеваниям относятся: фенилкетонурия (#261600, ген PAH); муковисцидоз (#219700, ген CFTR); спинально-мышечная амиотрофия (#253300, ген SMN); несиндромальная нейросенсорная тугоухость (#220290, ген GJB2); врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) или адреногенитальный синдром (#201910, ген CYP21A2).

Обследование кандидатов в доноры гамет (ооцитов и сперматозоидов) для лечения методами ВРТ проводится в соответствии с приказом МЗ РФ от 31 июля 2020 г. №803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Донорами гамет могут быть женщины и мужчины в возрасте от 18 до 35 лет, физически и психически здоровые. Доноры проходят обязательное медико-генетическое консультирование. При этом единственный генетический анализ, обязательный к выполнению, — это кариотипирование, которое дает недостаточно информации для полноценной оценки рисков развития генетических заболеваний у потомства при применении гамет конкретного донора.

Цель и задачи. Учитывая высокую частоту встречаемости указанной группы аутосомно-рецессивных заболеваний и их значение в программах ВРТ с применением донорского материала, цель данного исследования — обоснование про-

ведения генетического скрининга на носительство патогенных мутаций, вызывающих данные заболевания у доноров ооцитов и спермы. Задачей данного исследования является выявление истинной частоты встречаемости на основе результатов генетического скрининга доноров гамет отделений ВРТ клиник АО «Медицинская компания ИДК».

Материалы и методы. Кандидаты в доноры гамет предварительно были проконсультированы на отсутствие наследственных заболеваний у них и ближайших родственников. Было произведено исследование на кариотип, для исключения факторов повышенного риска пороков развития плода и невынашивания беременности. Все кандидаты были обследованы и предварительно одобрены. Таким образом, данная группа обследуемых может считаться репрезентативной группой для выявления частоты носительства патогенных мутаций среди условно здоровых лиц репродуктивного возраста.

Кандидаты в доноры гамет обследованы на носительство частых патогенных мутаций генов: PAH, CFTR, SMN, GJB2, CYP21A2. Исследование проводилось на базе лабораторий ООО «Центр молекулярной генетики» (Москва) и ООО «Сербалаб» (Санкт-Петербург). Для исследования использовалась венозная кровь обследуемых с антикоагулянтом K2EDTA.

Результаты. Всего за период 2016–2022 гг. обследовано 240 кандидатов, у 48 из них выявлено носительство патогенных мутаций частых аутосомно-рецессивных заболеваний. У 4 выявлена мутация PAH(с.782G>A (p.Arg261Gln), R408W, n/R261Q); у 9 выявлено носительство делеции гена SMN1; выявлено 5 носителей мутации гена CFTR (с.54 5940_273+10250del21kb (CFTRdele2,3), с.274G>A (E92K), delF508; у 8 мутация гена GJB2. Самой многочисленной (у 22) группой стали мутации гена CYP21A2 (Q319X, V281L, C1994T).

ТАБЛИЦА. ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА ПАТОГЕННЫХ МУТАЦИЙ ЧАСТЫХ АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. (N=280)

	Носителей мутаций (%)	Частота
CYP21A2 (ВДКН)	9,2	1/11
SMN (СМА)	3,8	1/27
GJB2 (нейрос.тугоухость)	3,3	1/30
CFTR (муковисцидоз)	2,1	1/48
PAH (фенилкетонурия)	1,7	1/60
Всего	20	1/5

Заключение и выводы. Таким образом, самыми частыми выявленными были мутации гена CYP21A2, спо-собствующие развитию адреногенитального синдрома. Столь значительное расхождение между полученной частотой встречаемости носительства и наблюдаемой частотой выяв-ляемого заболевания (примерно, 1:9000) можно объяснить высокой вариабельностью ферментопатии, связанной с мутацией гена CYP21A2 с преобладанием т.н. «мягких» неклассических форм ВДКН, протекающих на субклиническом уровне и часто выявляемых случайно у пациенток с нарушениями овариально-менструального цикла. Для мужчин вообще диагно-

стика многих субклинических форм ВДКН затруднена.

Носительство других исследованных аутосомно — рецессивных мутаций также велико, что значительно увеличивает риски рождения ребенка с аутосомно-рецессивным заболеванием у супружеской пары, воспользовавшейся донорской программой ВРТ. Поскольку полученные частоты встречаемости и вероятности рождения ребенка с такими заболеваниями от донора, не прошедшего генетический скрининг, выше популяционных, можно считать обоснованным и оправданным предварительное генетическое тестирование доноров гамет на носительство патогенных мутаций частых аутосомно-рецессивных заболеваний.

NGS-ПАНЕЛЬ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ДИСЛИПИДЕМИЙ — ПЕДИАТРИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ СИТОСТЕРОЛЕМИИ

Пчелина С.Н.¹, Захарова Е.Ю.², Линькова С.В.³, Мирошникова В.В.¹

¹ ПСПбГМУ им акад И П Павлова

² Медико-генетический научный центр им НП Бочкова

³ СПб ГБУЗ детский городской многопрофильный клинический центр высоких медицинских технологий им К.А.Раухфуса

Актуальность. В настоящее время актуальным является выявление в структуре дислипидемий наследственной патологии, поскольку от этого может зависеть стратегия лечения.

Цель. Разработать NGS-панель для диагностики дислипидемий и с ее использованием провести дифференциальную диагностику дислипидемий среди лиц с нарушением дипидного спектра.

Методы. С использованием разработанной нами панели для диагностики дислипидемий, включающей определение кодирующей последовательности 39 генов, выявлен случай аутосомно-рецессивного заболевания, ситостеролемии у девочки 6 лет. Заболевание обусловлено — носительством мутаций в гене транспортера стеролов ABCG8 (компаундная гетерозигота p.Leu572Pro/p.Gly512Arg). Семья пробанда обратилась в клинику с симптомами раннего пубертата (оволосенение лобковой зоны). При обследовании было выявлено повышение уровня общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности до 12,6 и 9,6 ммоль/л, соответственно, с подозрением на семейную гиперхолестеринемию пробанду был рекомендован генетический анализ. Следует отметить, что использование расширенной NGS-панели с включением генов, кодирующих транспортеры

ABCG5 и ABCG8 позволило установить верный диагноз, который в последствии был подтвержден биохимическим исследованием. Уровень фитостеролов в крови пробанда составил 28,3 и 12,4 микромоль/л для ситостерола и кампестерола, соответственно, что в 10 раз выше нормы. В ряде случаев диагноз ситостеролемиа может маскироваться под семейную гиперхолестеринемию.. Однако, при ситостеролемии в организме в первую очередь накапливаются растительные жиры. Установление диагноза в раннем возрасте дает возможность назначения диеты с ограничением фитостеролов, что в будущем позволит избежать преждевременного развития сердечно-сосудистых заболеваний и других осложнений.

Выводы. Проведение генетического исследования с использованием разработанной NGS –панели позволило в составе мультифакторной патологии позволил выявить случай редкого аутосомно-рецессивного заболевания, ситостеролемии. Описанный случай подчеркивает диагностическую значимость использования NGS — панелей для постановки верного диагноза при диагностике дислипидемий.

Исследование выполнено при поддержке программы Министерства науки и образования «Приоритет 2030» (Соглашение 075-15-2023-132 от 14 февраля 2023).

ПАТОГЕННЫЕ ВАРИАНТЫ В ГЕНАХ *PKD1*, *PKD2*, *HNF1b*, *PKHD1*, *NPHP1*, *TMEM67*, *INVS* И КЛИНИЧЕСКИЙ ФЕНОТИП НАСЛЕДСТВЕННЫХ КИСТОЗОВ ПОЧЕК У 22 ДЕТЕЙ

Андреева Э.Ф., Савенкова Н.Д.

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Наследственные кистозные болезни почек имеют особенности фенотипа, течения и прогноза в детском возрасте. Определение у пробандов разнообразия вариантов в генах *PKD1*, *PKD2*, *HNF1b*, *PKHD1*, *NPHP1*, *TMEM67*, *INVS* представляется важным и своевременным.

Цель. Представить результаты анализа фенотипа и патогенных вариантов (встречающихся в базах данных и ранее не описанных) в генах, ответственных за развитие наследственных кистозных болезней почек с АД — аутосомно-доминантным (*PKD1*, *PKD2*, *HNF1b*) и АР — аутосомно-рецессивным (*PKHD1*, *NPHP1*, *TMEM67*, *INVS*) типами наследования у детей.

Материалы и методы. 22 детям в возрасте 1 месяц — 17 лет с двусторонним кистозом почек проведено полногеномное секвенирование ДНК в лабораториях, имеющих действующую лицензию на осуществление медицинской деятельности и проведение ДНК тестов и медицинское оборудование, зарегистрированное в РФ. Полученные последовательности выравнены по референсному геному человека (GRCh37/hg19).

Результаты. По результатам генеалогического метода в 3 (13,6%) из 22 семей выявлены родственники 1 степени родства с кистозным поражением почек. Из 22 детей у 9 фенотип соответствовал аутосомно-рецессивной поликистозной болезни почек (АРПБП), у 7 аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек (АДПБП), у 3 гломерулокистозной болезни почек (ГКБП), у 3 нефронофтизу (НФ).

Из 22 детей, у 10 (45,5%) выявлены варианты в гетерозиготном состоянии в генах с АД типом наследования, из них у 6 в гене *PKD1*, у 1 в гене *PKD2*, у 3 в гене *HNF1b*. У 12 (54,5%) детей диагностированы варианты в генах с АР типом наследования, из них у 8 в гене *PKHD1*, у 1 в гене *NPHP1*, у 1 в гене *TMEM67*, у 1 в гене *INVS*, находящиеся в компаунде с вариантами с неопианной ранее клинической значимостью или в гомозиготном состоянии (таблица). У 1 пациента с мужским аномальным кариотипом (46, XY, der(12) de novo) при проведении молекулярно-цитогенетического исследования уточнен характер структурной аномалии в виде интерстициальной делеции короткого плеча 12-й хромосомы (del 12p). Среди установленных вариантов в генах *PKD1*, *PKD2*, *HNF1b*, *PKHD1*, *NPHP1*, *TMEM67*, *INVS*, 53% имеют известную патогенную значимость описанную ранее (опис.пат), 47% (варианты в генах *PKD1*, *HNF1b*, *PKHD1*, *INVS* и del 12p) не описаны ранее в базах данных у детей с кистозным поражением паренхимы почек (н/опис).

Заключение. Из 22 детей, особенности патогенных вариантов в генах, ответственных за развитие АДПБП (*PKD1*, *PKD2*) и АРПБП (*PKHD1*) установлены у 15; ГКБП (*HNF1b*) у 3; НФ (*NPHP1*, *INVS*, *TMEM67*) у 3; хромосомная мутация (del 12p) у одного. У 22 пациентов с кистозами почек в 47% идентифицированы ранее не описанные варианты генов *PKD1*, *HNF1b*, *PKHD1*, *INVS* и хромосомная мутация (del12p).

ТАБЛИЦА. ВАРИАНТЫ В ГЕНАХ *PKD1*, *PKD2*, *HNF1b*, *PKHD1*, *NPHP1*, *TMEM67*, *INVS* У 22 ДЕТЕЙ С КИСТОЗАМИ ПОЧЕК

№	ген	хромосома/ транскрипт	экзон	положение в кДНК	эффект	зиготность, тип наследования	диагноз
1	<i>PKD1</i> опис.пат	16:2160371; G>T	15	c.4797C>A	p.Tyr1599Ter, образование стоп-кодона	гетерозигота, АД	АДПБП
2	<i>PKD1</i> опис.пат	16:NM_000296.4		c.5976_5978del	p.Phe1992_Thr1993delins Leu	гетерозигота, АД	АДПБП
3	<i>PKD1</i> опис.пат	16:2169121; CTTAAA>C	3	c.348_352del	p.Asn116Lysfs*2, образование стоп-кодона	гетерозигота, АД	АДПБП
4	<i>PKD1</i> н/опис	16:2106800; C>T ENST00000262304		c.7209+5G>A	влияет на сплайсинг гена	гетерозигота, АД	АДПБП
5	<i>PKD1</i> опис.пат	16:g.2168304; C>G ENST00000262304 ENSP00000262304	5	c.689G>C	p.Cys230Ser, миссенс	гетерозигота, АД	АДПБП
6	<i>PKD1</i> н/опис	16:2102845; G>C ENST00000262304		c.8917C>G	p.His2973Asp	гетерозигота, АД	АДПБП
7	<i>PKD2</i> опис.пат	4:88968008; G>T	6	c.1534G>T	p.Val512Phe, миссенс	гетерозигота, АД	АДПБП
8	<i>PKHD1</i> опис.пат	6:51947999; G>A	3	c.107C>T	p.Thr36Met, миссенс	гетерозигота, АР	АРПБП
	<i>PKHD1</i> н/опис	6:51887734; C>A	33	c.5245G>T	p.Gly1749Cys, миссенс	гетерозигота, АР	

9	<i>PKHD1</i> <i>onic.nam</i>	6:51923147; G>G/A ENST00000371117	16	c.1486C>C/T	p.R496Ter, нонсенс, образование стоп- кодона	гетерозигота, АР	АРПБП
	<i>PKHD1</i> <i>h/onic</i>	6:51889479; G>G/A ENST00000371117	32	c.5129C>C/T	p.Pro1710Lei, миссенс	гетерозигота, АР	
10	<i>PKHD1</i> <i>onic.nam</i>	6:52083201; G>A ENST00000371117		c.107C>T	p.Thr36Met	гетерозигота, АР	АРПБП
	<i>PKHD1</i> <i>h/onic</i>	6:51775870; C>T ENST00000371117		c.8492G>A	p.Arg2831Lys	гетерозигота, АР	
11	<i>PKHD1</i> <i>onic.nam</i>	6:51947999G>A NM_138694.3		c.107C>T	p.Thr36Met	гетерозигота, АР	АРПБП
	<i>PKHD1</i> <i>h/onic</i>	6:51923171; G>A NM_138694.3		c.1462C>T	p.Arg488Trp	гетерозигота, АР	
12	<i>PKHD1</i> <i>onic.nam</i>	6:51867879; G>A ENST00000371117 ENSP00000360158	48	c.7717C>T	p.Arg2573Cys	гомо/ гемизигота, АР	АРПБП
13	<i>PKHD1</i> <i>onic.nam</i>	6:NM_138694.4		c.107C>T	p.Thr36Met	гетерозигота, АР	АРПБП
	<i>PKHD1</i> <i>onic.nam</i>	6:NM_138694.4		c.6992T>A	p.Ile2331Lys	гетерозигота, АР	
14	<i>PKHD1</i> <i>h/onic</i>	6:51659682; G>A ENST00000371117		c.10444C>T	p.Arg3482Cys	гетерозигота, АР	АРПБП
	<i>PKHD1</i> <i>h/onic</i>	6:52083205; C>T ENST00000371117		c.103G>A	p.Gly35Arg	гетерозигота, АР	
15	<i>PKHD1</i> <i>onic.nam</i>	6:51947999; G>A			p.Thr36Met	гетерозигота, АР	АРПБП
	<i>PKHD1</i> <i>onic.nam</i>	6:51935807; T>C			p.Ile222Val	гетерозигота, АР	
16	<i>HNF1b</i> <i>h/onic</i>	17:g.37739611; T>A ENST00000617811 ENSP00000480291	2	c.373A>T	p.Ile125Phe	гетерозигота, АД	ГКБП
	<i>PKD2</i> <i>h/onic</i>	4:g.88007877; G>C ENST00000237596 ENSP00000237596	1	c.144G>C	p.Glu48Asp	гетерозигота, АД	
	<i>PKHD1</i> <i>h/onic</i>	6:g.52082456; G>A ENST00000371117 ENSP00000360158	4	c.217C>T	p.Arg73Trp	гетерозигота, АР	
17	<i>HNF1b</i> <i>onic.nam</i>	17:g.36099601; A>G ENST00000225893 ENSP00000225893	2	c.374T>C	p.Ile125Thr	гетерозигота, АД	ГКБП
	<i>PKHD1</i> <i>onic.nam</i>	6:g.51751973; G>A ENST00000371117 ENSP00000360158	44	c.7067C>T	p.Pro2356Leu	гетерозигота, АР	
	<i>PKHD1</i> <i>h/onic</i>	6:g.51918907; G>C ENST00000371117 ENSP00000360158	20	c.1893C>G	p.Phe631Leu	гетерозигота, АР	
18	<i>HNF1b</i> <i>h/onic</i>	17:36104713; C>A	1	c.163G>T	p.Glu55Ter, образова- ние стоп-кодона	гетерозигота, АД	ГКБП
19	<i>NRHP1</i> <i>onic.nam</i>	2:110097497- 110212771			del(~115Kb)	гомозигота, АР	НФ1
20	<i>INVS</i> <i>h/onic</i>	9:g.100246787; G>C ENST00000262457 ENSP00000262457	8	c.1078G>C	p.Ala360Pro	компаунд- гетерозигота	НФ2
	<i>INVS</i> <i>h/onic</i>	9:g.100246489; A>C ENST00000262457	интрон 7	c.907-127A>C			

21	ТМЕМ67 onuc.nam	8:g.93795970;T>C ENST00000453321 ENSP00000389998	18	с.1843 T>C	p.Cys615Arg	гомо/ гемизигота, AP	HФ11
22	n/onuc	del(12)(p)ish12psubtel(8M16/ SP6X2),12qsubtel(VIjYRM2196X2)del(12)(p) ish12(wep12++)					del12p

ЧАСТЫЕ МУТАЦИИ ГЕНА *CFTR* У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Комова Е.Г.¹, Пинегина Ю.С.², Коренева Г.В.³

¹ АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

² ГБУЗ Новосибирской области «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», Новосибирск, Россия

³ НРООИ «Ген Милосердия», Новосибирск, Россия

Введение. Муковисцидоз (МВ) — тяжелое моногенное заболевание, частота которого составляет около 1:7000 новорожденных. Причиной МВ являются мутации гена *CFTR*, которые приводят к формированию нефункционального ион-обменного канала, обеспечивающего проводимость ионов в мембранах эпителиальных клеток. Дефекты транспортного канала приводят к формированию густого слизистого секрета всех желез внешней секреции и ухудшению их функционирования. Для МВ разработана таргетная терапия в зависимости от типа мутации. Поэтому знать точный генотип пациента необходимо для получения эффективного лечения, восстанавливающего именно тот дефект, который выявлен у пациента. Не всегда пациент может быстро получить результат генотипирования, в частности это касается регионов, где есть затруднения как с постановкой таких анализов, так и с анализом спектра мутаций, которые не распространены на территории данного региона. Это приводит к удлинению времени анализа за счет отправки образца в Медико-Генетический центр и секвенирования экзонов гена *CFTR*. Создание систем для выявления мутаций, характерных в разных регионах повысит скорость диагностики и получения результата генотипирования пациентов, что в свою очередь ускорит получение пациентами эффективной таргетной терапии.

Цель. Выявить мутации гена *CFTR* у пациентов больных МВ г. Новосибирска и области.

Задачи. Разработать системы для выявления частых мутаций гена *CFTR*, выявить спектр мутации у больных МВ в регионе Новосибирск.

Материалы и методы. Цельная кровь и сухие пятна крови от пациентов больных МВ, проживающих на территории Новосибирска и области (n=22). Выделение ДНК проводили с помощью наборов «ДНК-Экспресс Генетика» или «ДНК Экстракция 100» производства АО «Вектор-Бест» (Новосибирск) согласно инструкции производителя. ПЦР проводили в режиме реального времени на приборах CFX-96 (Bio-Rad, США) или ДТ, ДТ-Прайм (ООО «ДНК-Технология»), или FLUORITE (TiaLong, Китай). Выявление мутаций осуществляли с помощью собственных разработанных систем. В одной пробирке осуществляли детекцию двух мутаций по разным каналам. Подтверждение генотипов и поиск редких мутаций осуществляли секвенированием по Сэнгеру. Подбор специфичных праймеров и зондов осуществляли, ис-

пользуя базы данных BLAST, dbSNPs, и программу для оценки эффективности олигонуклеотидов IDT OligoAnalyser.

Результаты. За основу при разработке систем для выявления частых мутаций *CFTR*, мы взяли список, рекомендованный в Клинических Рекомендациях по МВ и список частых мутаций, представленный в Регистре больных МВ Российской Федерации. Набор мутаций, которые мы анализировали, включает: Phe508del, Gly542X, del 2,3 kb, Glu92Lys, Gln685Thr, 3849+10kb C>T, Leu671X, Tyr515X, Leu138insLeu, Asn1303Lys, Trp1282X, Trp1282Arg, Ser1196X, Ser466X, Leu467Phe, Arg334Trp, Gly85Glu. Готовые лиофилизированные реакционные смеси (ГРС) предназначены для выявления двух мутаций в одной пробирке.

Среди проанализированных образцов пациентов больных муковисцидозом, нами были найдены следующие мутации, в скобках указано количество выявленных мутантных аллелей: Phe508del (n=13), Gly542X (n=3), del 21 kb (n=6), Leu671X (n=2), Trp1282Arg (n=3), Ser466X (n=2), по одному мутантному аллелю выявлено для Glu92Lys, Gly85Glu, Asn1303Lys, с.580-1 G>T, с.3528 delC, с.3691 delT, с.4242+1 G>A. Мутации, которые не входят в список частых Регистра, среди наших образцов составляют около 22% относительно всех выявленных мутаций в данном исследовании. Среди наших образцов 3 раза встретилась мутация Trp1282Arg и два раза Ser466X, что говорит о высокой частоте встречаемости вариантов в нашем регионе. Их мы также включили в диагностический набор, эти мутации занимают в Регистре за 2020-й г. 15 и 14 положение по частоте, соответственно, то есть характерны и для других регионов. Самыми частыми в нашем исследовании оказались мутации Phe508del (29,5 %) и del 21 kb (13,6 %).

Заключение. Развитие технологий и возможностей диагностики в регионах за последние несколько лет расширило понимание того, что в разных частях РФ распространены свои специфичные мутации *CFTR*. О чем свидетельствуют исследования в Карачаево-Черкессии, например, где самой представленной мутацией является Tyr515X, тогда как в европейской части — Phe508del. Большинство исследований описывают мутации Центрального Федерального округа, что не отражает картину распространения мутаций в других регионах. Полученные нами данные пусть на небольшой выборке, подтверждают предположение существования

специфичных мутаций в регионах. Наша страна этнически гетерогенна. Для изучения спектра мутаций в регионах и поиска новых специфичных дефектов требуется дальнейшее изучение. Полученные данные и разработанные на их основе системы для анализа мутаций *CFTR* помогут быстрее

пациентам и их лечащим врачам получать результат генотипирования, что ускорит решение по получению таргетной терапии. Разработанный нами набор позволяет выявлять частые мутации, характерные для большинства регионов РФ и, в частности, Новосибирска и НСО.

МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ЗАМЕН ИНВАРИАНТНОГО Cys1079 НА Phe ИЛИ Gly В МЕДЬ-ТРАНСПОРТНОЙ АТФ-азе АТР7В, ВЕДУЩИХ К РАЗВИТИЮ БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА ИЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Санькова Т.П.¹, Ильичева Е.Ю.^{1,2,3}, Карпенко М.Н.^{1,2}, Муружева З.М.^{1,2}, Пучкова Л.В.^{1,2,3}

¹ Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

² Институт Экспериментальной Медицины, Санкт-Петербург, Россия

³ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Болезнь Вильсона (БВ), или гепатолентикулярная дегенерация — относительно редкое (от 1 до 7 на 100000 населения) наследственное аутосомно-рецессивное заболевание, за развитие которого ответственны мутации в гене *АТР7В*, медь-транспортной АТФазы Р1 типа, которая у взрослых млекопитающих преимущественно экспрессируется в печени и мозге. Ген *АТР7В* расположен на хромосоме 13q14.3, его длина составляет 80 т.п.н. и включает 21 экзон. Зрелый транскрипционный продукт имеет длину около 7 т.п.н. и программирует синтез белка из 1411 аминокислотных остатков. У пациентов с БВ изменение белкового продукта гена *АТР7В* приводит к блокаде вывода избытка меди через желчь и одновременно к ее накоплению в печени, мозге и других органах. При этом из-за дефицита меди, поступающей в люмен аппарата Гольджи, концентрация церулоплазмина (ЦП), основного внеклеточного медьсодержащего белка, и ассоциированной с ним меди, в сыворотке крови снижается в несколько раз. К настоящему времени описано более 600 вариантов мутаций в гене *АТР7В*, ответственных за развитие БВ. Они включают однонуклеотидные замены, нонсенс мутации, инсерции и делеции, а также мутации в сплайс сайтах и масштабные перестройки (ОМIM# 606882). Наиболее часто мутации затрагивают кодируемый в 14 экзоне нуклеотид-связывающий домен (более 70% у пациентов кавказской популяции). Некоторые из них в гетерозиготном состоянии встречаются у пациентов с ранним началом болезни Паркинсона (БП), неврологические симптомы которой во многом совпадают с симптомами БВ. К тому же, у 1/3 пациентов с БП, как и у пациентов с БВ, показатели статуса меди в сыворотке крови (концентрация атомной меди, оксидазного и иммунореактивного церулоплазмина) снижены. Учитывая тот факт, что БВ тяжелое инвалидизирующее заболевание, а у гетерозиготных носителей гена БВ высокий риск развития БП, разработка недорогих методов выявления известных мутаций в гене *АТР7В* является актуальной задачей.

Ранее, в результате прямого секвенирования экзона 14 гена *АТР7В* в когорте из 33 пациентов с БП северо-западного региона РФ с подтвержденным диагнозом, была выявлена новая замена с.3235Т>G, которая приводит к несинонимической замене инвариантного цистеина на глицин в положении 1079 (C1079G). С помощью метода выравнивания

известных последовательностей ортологов *АТР7В*, было показано, что этот остаток цистеина консервативен. Мутация в этом же кодоне, приводящая к замене цистеина на фенилаланин, описана в Китае у пациента с БВ в компаундном состоянии. Мы разработали метод одновременного выявления обеих мутаций, основанный на полиморфизме длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Метод заключается в генотипировании соответствующих однонуклеотидных полиморфизмов в 14 экзоне гена *АТР7В* человека (миссенс мутации) с.3235Т>G и с.3236G>Т методом полимеразной цепной реакции и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). ПЦР проводят с использованием образца геномной ДНК, выделенной из лейкоцитов крови пациента, прямого праймера 5'-acaagactggcaccattaccса-3' и обратного праймера 5'-acgccccagtccacgtaactctgta-3'. Рестриктию ПЦР-продукта размером 182 п.н. проводят эндонуклеазой BstAU I (TGТАСА). Для образцов гомозиготных носителей аллелей с.3235ТТ и с.3236GG (вариант нормы) эндонуклеаза BstAU I расщепляет ПЦР-продукт размером 182 п.н. на два фрагмента 156 и 26 п.н. При наличии мутантного аллеля с.3235G или с.3236Т гена *АТР7В* исчезает сайт узнавания для эндонуклеазы BstAU I и продукт рестрикции визуализируется при электрофоретическом разделении ПЦР-продуктов в агарозном геле в виде одного фрагмента размером 182 п.н. Таким образом, у гетерозиготных носителей аллелей с.3235TG, с.3236GG или с.3235ТТ с.3236GT присутствуют три фрагмента ДНК: 182, 156 и 26 п.н. Именно такие варианты гетерозиготных генотипов *АТР7В* описаны у больных БП и БВ [Ilyechova E.Y. et al. Case of Early-Onset Parkinson's Disease in a Heterozygous Mutation Carrier of the АТР7В Gene. J. Pers. Med. 2019; 9: 41. doi: 10.3390/jpm9030041.; Wang L.-H. et al. Mutation analysis of 73 southern Chinese Wilson's disease patients: Identification of 10 novel mutations and its clinical correlation. J. Hum. Genet. 2011; 56:660-665. doi: 10.3390/jpm9030041].

Представленный нами метод может быть использован для диагностики предрасположенности к болезни Вильсона и/или болезни Паркинсона путем генотипирования новых патогенетически значимых мутаций р.Cys1079Gly и р.Cys1079Phe медь-транспортной АТФазы человека.

Работа поддержана грантами РФФИ 20-515-7813 и РФНФ 20-74-10087 (руководитель Ильичева Е.Ю.).

ГЕНЕТИКА ЛОБНО-ВИСОЧНОЙ ДЕМЕНЦИИ

Ю.А. Шпилюкова, Е.Ю. Федотова, Н.Ю. Абрамычева, С.Н. Иллариошкин

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Актуальность. Лобно-височная деменция (ЛВД) — гетерогенная группа расстройств поведения, личности и/или речи, ассоциированная с нейродегенеративным процессом лобных и височных долей. ЛВД является второй по частоте причиной деменции с ранним началом (до 65 лет). Диагностика клинических синдромов заболевания основана на диагностических критериях (Rascovsky et al., 2011; Gorno-Tempini et al., 2011), однако в связи с широким перекрытием фенотипов с болезнью Альцгеймера и синдромами атипичного паркинсонизма, требуется использование биомаркеров для точной установки диагноза. Биомаркеров патологического процесса для ЛВД в настоящее время не существует, но учитываемая высокая частота (до 40%) генетических форм результат генетического скрининга может использоваться в качестве подтверждающего биомаркера заболевания. Согласно данным литературы наиболее часто мутации при ЛВД встречаются в 3 генах: *C9orf72*, *GRN*, *MAPT*.

Цель и задачи. Оценить встречаемость и фенотипические характеристики частых генетических форм ЛВД в российской выборке пациентов.

Материалы и методы. Исследование выполнено на базе Отделения наследственных и нейродегенеративных заболеваний ФГБНУ НЦН (Москва). Проанализирована локальная база данных пациентов с ЛВД на момент августа 2023 года (N=265), из них 101 пациент имеют отягощенный семейный анамнез (38%). ДНК-диагностика на наличие экспансии повторов в гене *C9orf72* выполнена 228 пациентам (108 семейные), оценка наличия мутаций в гене *GRN* и *MAPT* выполнена 80 пациентам (35 семейные). Наличие экспансии повторов в гене *C9orf72* оценивалось с помощью ПЦР с использованием праймера, специфичного к области повторов. Наличие мутаций в генах *GRN* и *MAPT* оценивали с использованием секвенирования по Сэнгеру или с использованием методик массового параллельного секвенирования с последующим подтверждением с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Основные результаты. Группа с оценкой экспансии повторов в гене *C9orf72* (N=228). Всего в данной группе вы-

явлено 14 случаев ЛВД, ассоциированных с данной мутацией (6%). Средний возраст дебюта составил 56±10 лет (38–77). 12 из 14 случаев оказались семейными. Таким образом, частота мутации среди семейных случаев составляет 11%, среди спорадических — 2%. В 8 из 14 случаев отмечено сочетание симптомов ЛВД (поведенческие и/или речевые расстройства) с симптомами бокового амиотрофического склероза. Группа с оценкой мутаций в гене *GRN* (N=80). Всего в данной группе выявлено 10 случаев с мутацией (13%). Средний возраст дебюта составил 57±8 лет (47–71). 6 из 10 случаев оказались семейными. Таким образом, частота мутаций среди семейных случаев составляет 19%, среди спорадических 8%. Клиническая картина в данных случаях представляла собой изолированный поведенческий (N=5) или речевой (N=5) фенотипы. Группа с оценкой мутаций в гене *MAPT* (N=80). Выявлен 1 пациент без отягощенного семейного анамнеза (1%) с дебютом заболевания в 35 лет с быстро прогрессирующей апраксии речи, асимметричной апраксии и паркинсонизма в конечностях. Также выявлена 1 пациентка с ранее не описанной мутацией и отягощенным семейным анамнезом с поведенческим фенотипом и возрастом дебюта 74 года. Таким образом частота мутаций в гене *MAPT* в общей выборке составила 3% (3% среди семейных и 2% среди спорадических случаев).

Заключение и выводы. Наиболее распространенной генетической формой ЛВД среди российских пациентов является *GRN*-ассоциированная форма — 13% в общей выборке, 19% среди семейных форм и 8% среди спорадических. На втором месте находится *C9orf72*-ассоциированная форма — 6% в общей выборке, 11% среди семейных и 2% среди спорадических форм. Наиболее редкой является *MAPT*-ассоциированная форма — 3% в общей выборке, 3% среди семейных и 2% среди спорадических форм. Таким образом, каждая из данных генетических форм выявляется не только среди семейных случаев, но и среди спорадических, что говорит о целесообразности ДНК-диагностики даже в спорадических случаях заболевания.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ НОСИТЕЛЬСТВА МОНОГЕННОЙ ПАТОЛОГИИ СРЕДИ БЕСПЛОДНЫХ ПАР В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Дерябина С.С., Лагутина О.В., Кудрявцева Е.В.

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Российская Федерация;

ГАУЗ СО «КДЦ «Охрана здоровья матери и ребенка», Екатеринбург, Российская Федерация

Актуальность. В последнее десятилетие в России общей тенденцией является расширение географии репродуктивных центров и рост услуг вспомогательных репродуктивных технологий. Однако использование ВРТ не может автоматически предотвратить рождение

больных детей. В нашем регионе известно как минимум 3 случая такого печального сценария: в результате программы ЭКО родились 2 ребенка с муковисцидозом и 1 ребенок с фенилкетонурией. С 2023 года мы готовы предложить будущим родителям тестирование на гетерози-

готное носительство тяжелой наследственной патологии.

Цель работы: поиск гетерозиготных носителей самых частых патогенных генетических вариантов четырех моногенных заболеваний — муковисцидоза (МВ), фенилкетонурии (ФКУ), дефицита среднецепочечной ацил-КоА дегидрогеназы жирных кислот и спинальной мышечной атрофии (СМА) среди бесплодных пар.

Методы: Для поиска генетических вариантов моногенных заболеваний применялись простые молекулярно-генетические методы ПДРФ и ПДАФ, носительство СМА определяли с помощью мультиплексной реакции лигирования (MLPA).

Результаты: В проспективное исследование вошли первые 350 образцов ДНК, выделенных из цельной крови мужчин и женщин, участвующих в программах вспо-

могательных репродуктивных технологий в ГАУЗ СО «КДЦ «Охрана матери и ребенка». В результате проведенного исследования обнаружены 17 гетерозиготных носителей патогенных генетических вариантов: p.F508del (*CFTR*) — 3 носителя, p.R408W (PAH) — 4 носителя и делеции 7 экзона в гене *SMN1* — 10 носителей. У партнеров данных носителей проведен углубленный поиск генетической патологии в указанных генах, изменений не обнаружено.

Заключение: Полученные результаты дают предпосылку для научного обоснования внедрения прекоцепционного скрининга в медицинскую практику с целью предотвращения рождения детей с моногенной патологией в регионе, а в перспективе — восстановления демографического баланса населения Свердловской области.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ПЦР-РВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГОМОЗИГОТНОЙ ДЕЛЕЦИИ ЭКЗОНА 7 ГЕНА *SMN1* В УЗБЕКИСТАНЕ

Воронцов Р.Н.¹, Касимов А.Э.^{1,2}, Дё К.Г.^{1,2}, Хегай Т.Р.^{1,2}

¹ООО «ROSSA», г. Нурафшан, Узбекистан

²Институт Иммунологии и Геномики человека АНРУз, г.Ташкент, Узбекистан

Введение. Проксимальная спинальная мышечная атрофия (СМА) 5q — аутосомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся утратой двигательных нейронов в передних рогах спинного мозга, что приводит к прогрессирующему поражению проксимальных отделов скелетной мускулатуры. Развитие СМА в 95% случаев связано с гомозиготной делецией гена *SMN1* (5q12.2-q13.3) и последующим снижением синтеза белка выживаемости мотонейронов. С 2022 года в Узбекистане ведется Единый национальный регистр семей с клиническим диагнозом «спинальная мышечная атрофия» и вопрос неонатального скрининга новорожденных становится более актуальным. В Узбекистане своих систем для диагностики СМА пока не создано.

Цели и задачи. Разработать ПЦР-РВ тест-систему для выявления гомозиготной делеции экзона 7 гена *SMN1*. Задачи включали дизайн праймеров и зондов, оптимизация условий для ПЦР.

Материалы и методы. Выделенная ДНК пациентов с клинически подтвержденным диагнозом СМА, носителей мутации в гене *SMN1* и ДНК здоровых лиц, была предоставлена Институтом Иммунологии и Геномики человека АНРУз (г.Ташкент). Концентрация ДНК составляла от 12,0 нг/мкл до 28,2 нг/мкл. Все образцы были разделены на 3 группы (без учета гена *SMN2*): 1) «Норма» — с двумя копиями гена *SMN1*; 2) «Делеция» — с отсутствием гена *SMN1*; 3) «Носитель» — с одной копией гена *SMN1*.

ПЦР-РВ проводили на амплификаторах qTOWER3 (Analytik Jena) и CFX96 (Biorad) по протоколу: 95 °C — 15 мин, 40 циклов: 95 °C — 5 с, 60°C — 15 с, 72°C — 15 с. Флуоресценцию детектировали по каналам HEX (для *SMN1*) и FAM (для β-глобина человека — внутренний контроль).

Основные результаты. Для обнаружения гомозиготной делеции экзона 7 гена *SMN1* и во избежание ложноположительных результатов вследствие возможной рекомбинации

между *SMN1* и *SMN2*, праймеры конструировали так, чтобы последовательность прямого праймера приходилась на интрон 6, последовательность обратного праймера — на экзон 7. Подбор праймеров проводили с расчетом на температуру отжига 60°C. Высокой специфичности 5'HEX/3'BHQ-1 зонда добивались путем подбора комплементарной последовательности к *SMN1*, включающей с.840С и тестирования различных комбинаций LNA-нуклеотидов. Для исключения неспецифического сигнала от *SMN2* тестировали LNA и 3' Spacer C3 модификации немеченого флуоресцентным-красителем *SMN2*-зонда (с.840Т). Праймеры и зонды подбирали с помощью программного обеспечения Primer3. Специфичность олигонуклеотидов оценивали с помощью приложения PrimerBLAST (NCBI). Все олигонуклеотиды синтезировали на базе ООО «ROSSA».

Проводили тестирование различных LNA-модификаций в *SMN1*-зонде и его попарного комбинирования с *SMN2*-зондом, модифицированным как LNA, так и 3' Spacer C3. Наблюдали слабую неспецифическую реакцию с флуоресценцией в некоторых образцах (с диагнозом СМА) при использовании модификации 3' Spacer C3. Неспецифического сигнала от LNA-модифицированного *SMN2*-зонда на образцах с диагнозом СМА не выявили. Таким образом, была составлена оптимальная комбинация праймеров/зондов для обнаружения гомозиготной делеции экзона 7 гена *SMN1*.

Далее проверяли оптимизированную тест-систему на всех предоставленных образцах. В группах «Норма» и «Носитель» все образцы были отрицательными на наличие делеции 7 экзона *SMN1* (детектировался сигнал по каналам HEX и FAM). В группе «Делеция» во всех образцах была делеция 7 экзона *SMN1* (детектировался сигнал только по каналу FAM). Данные, полученные с применением разработанной ПЦР-РВ системы согласуются с данными MLPA-анализа. Кроме того, в группе «Делеция» не

наблюдалось неспецифического сигнала от SMN2 при внесении до 282 нг ДНК в реакционную смесь.

Заключение. В Узбекистане нами разработана первая отечественная ПЦР-РВ тест-система для выявления

гомозиготной делеции экзона 7. Данная система в дальнейшем может найти применение в рамках неонатального скрининга новорожденных на наличие спинальной мышечной атрофии.

АЛГОРИТМЫ ДНК-ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ МОЗЖЕЧКОВЫХ АТАКСИЙ

Нужный Е.П., Абрамычева Н.Ю., Ключников С.А., Протопопова А.О., Иллариошкин С.Н.

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Введение. Наследственные мозжечковые атаксии — обширная и гетерогенная группа нейродегенеративных заболеваний, связанных с преимущественным поражением мозжечка и его связей, основными проявлениями которых являются расстройства координации движений и ходьбы. В настоящее время по механизму передачи в поколениях наследственные атаксии подразделяют на аутосомно-доминантные, аутосомно-рецессивные, X-сцепленные формы и атаксии с митохондриальным типом наследования. Разнообразии клинической картины и типов наследования, наличие «перекрестных» фенотипов, широкий диапазон возраста начала заболевания значительно осложняют задачу неврологов и медицинских генетиков при проведении клинической и молекулярно-генетической диагностики. В последние годы ситуация с молекулярным анализом наследственных атаксий значительно изменилась в связи с появлением технологий массового параллельного секвенирования (Massive Parallel Sequencing, MPS). Тем не менее, использование панельного и экзомного секвенирования не позволяет выявлять патологические экспансии микросателлитных повторов, приводящих к развитию распространенных форм атаксий: аутосомно-доминантных спиноцереbellарных атаксий (АД-СЦА) 1-го, 2-го, 3-го, 6-го, 7-го, 8-го, 17-го и др. типов, атаксии Фридрейха, синдрома тремора/атаксии, ассоциированного с ломкой X-хромосомой (FXTAS). В 2019 г. было установлено, что биаллельная экспансия AAGGG-повторов в гене RFC1 приводит новому типу аутосомно-рецессивной атаксии с поздним дебютом — синдрому CANVAS (от англ. cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome — мозжечковая атаксия с невропатией и двусторонней вестибулярной арефлексией). Описание новых молекулярных форм наследственных атаксий, а также клиническая и генетическая гетерогенность данной группы заболеваний требуют разработки новых диагностических алгоритмов с учетом распространенности отдельных нозологий в конкретной стране.

Цели и задачи. Разработка комплексного алгоритма диагностики наследственных мозжечковых атаксий, применимого для выборки российских пациентов с атаксиями дегенеративного генеза.

Материалы и методы. В исследование были включены 230 пациентов с мозжечковыми атаксиями дегенеративного генеза, обратившихся в ФГБНУ НЦН за 2016-2022 годы (медиана возраста 46 лет, от 18 до 77 лет, медиана возраста дебюта — 35 лет, от 3 до 64 лет). У всех включен-

ных в исследование больных было получено соответствующее информированное согласие.

Образцы геномной ДНК выделяли из цельной крови с использованием набора Wizard Genomic DNA Purification Kit («Promega», США). На первом этапе проводилось генотипирование тринуклеотидных повторов в генах наиболее распространенных форм аутосомно-доминантных спиноцереbellарных атаксий (АД-СЦА): *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3*, *CACNA1A*, *ATXN8/ATXN8OS*, *TBP* (СЦА 1-го, 2-го, 3-го, 6-го, 8-го, 17-го типов, соответственно) методом ПЦР с последующим анализом длин фрагментов на капиллярном генетическом анализаторе НАНОФОР 05 (Санкт-Петербург, Россия). Также при наличии характерной клинической картины проводился поиск экспансии CAG-повторов в гене *ATN1* (дентаторубропаллидолюсиса атрофия, ДРПЛА). При выявлении патологической экспансии для определения точного количества повторов и наличия вставок осуществляли секвенирование данного участка методом Сэнгера. На этом же этапе проводился поиск экспансии GAA-повторов в 1-м интроне гена *FXN* (атаксия Фридрейха) методом ПЦР с последующим разделением ампликонов в агарозном геле, а также генотипирование экспансии AAGGG-повторов в гене *RFC1* (синдром CANVAS) методом ПЦР с использованием праймеров, специфичных к повторам (repeat-primed PCR) и последующим фрагментным анализом.

Следующим этапом диагностики было проведение массового параллельного секвенирования на секвенаторе MiSeq (Illumina) с использованием оригинальной таргетной панели, состоящей из 240 генов наиболее значимых нейродегенеративных заболеваний (в том числе наследственные атаксии — 86 генов). Поиск вариантов осуществляли с помощью программы GATK 3.1, а их аннотацию — с помощью ресурса wANNOVAR. При оценке патогенности выявленных вариантов использовали базы данных: Human Gene Mutation Database, dbSNP, OMIM, ClinVar, руководство по интерпретации данных ACMG. Все положительные находки подтверждались методом капиллярного секвенирования на генетическом анализаторе НАНОФОР 05 (Санкт-Петербург).

Основные результаты. На первом этапе в результате скрининга на носительство экспансий в генах АД-СЦА был выявлен 51 (22,2%) пациент из 45 семей: СЦА 1-го типа — 18, СЦА 2-го типа — 11, СЦА 3-го типа — 8, СЦА 8-го типа — 6, СЦА 17-го типа — 8 пациентов. Пациенты с СЦА 6-го типа и ДРПЛА выявлены не были, что указыва-

ет на редкость данных форм в России. Также в обследованной выборке были выявлены 26 (11,3%) пациентов с атаксией Фридрейха — гомозиготные носители патологической экспансии GAA-повторов в гене *FXN*. Синдром CANVAS был диагностирован у 33 (14,3%) пациентов с билаллельной экспансией AAGGG-повторов в гене *RFC1*.

На следующем этапе генотипирование с использованием таргетной мультигенной MPS-панели было выполнено 120 пациентам, при этом молекулярный диагноз был установлен 57 (47,5%) больным. Среди аутосомно-рецессивных форм атаксий выявлены мутации в следующих генах: *POLG* (17 пациентов), *ATM* (6 пациентов), *ANO10* (4 пациента), *SETX* (4 пациента), *SACS* (3 пациента), *PNPLA6* (3 пациента), *APTX* (2 пациента), *SYNE1* (2 пациента), *NPC1* (2 пациента), *STUB1* (1 пациент). Среди аутосомно-доминантных форм — по одному случаю СЦА 14-го типа (ген *PRKCG*) и синдром Герстманна-Штраусслера-Шейнкера (ген *PRNP*). Кроме того, были выявлены пациенты с клинической картиной СЦА и мутациями в генах, связанных с развитием на-

следственных спастических параплегий (*SPG5* — 1, *SPG7* — 1, *SPG11* — 4 пациента), наследственных лейкодистрофий (ген *DARS2* — 2, *GALC* — 1 пациент), нейродегенераций с накоплением железа в головном мозге (по одному случаю — гены *PLA2G6* и *CP*).

Выводы. Использование предложенного диагностического алгоритма позволяет верифицировать 72,6% случаев наследственных мозжечковых атаксий, что сопоставимо с зарубежными данными. Наиболее частыми формами в российских семьях являются CANVAS, атаксия Фридрейха, АД-СЦА 1-го и 2-го типов и *POLG*-ассоциированные атаксии. Использование MPS-панели позволяет установить молекулярный диагноз у 47,5% обследованных пациентов. Полученные данные расширяют представления о распространенности отдельных нозологических форм наследственных атаксий, а также позволяют планировать более эффективный алгоритм молекулярной диагностики и осуществлять медико-генетическое консультирование в отягощенных семьях.

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ В ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *UGTR1*, АССОЦИИРОВАННОЙ С СИНДРОМОМ ЖИЛЬБЕРА, У ДЕТЕЙ С ГИПЕРБИЛИРУБИНИЕЙ

Перевезенцев О.А., Мамедов И.С.

Государственное бюджетное учреждение “Научно-практический центр специализированной помощи детям им.В.Ф.Войно-Ясенецкого”, г. Москва, Россия,

Актуальность темы. Билирубин — один из желчных пигментов, главный компонент желчи у человека. В крови билирубин содержится в небольших количествах в виде двух фракций: свободной и связанной. Повышение билирубина может говорить как об избыточном разрушении эритроцитов (гемолитическая желтуха и пр.), так и о нарушении выведении билирубина из организма, например при печеночной желтухе, закупорке желчных протоков и прочих патологических процессах. Одним из частых факторов, ассоциированных с непрямым гипербилирубинемией, является мутация в виде увеличения tandemных повторов TA в промоторной области гена фермента УДФГТ1*1 (*UGTR1*), который участвует в процессе связывания свободного билирубина с глюкуроновой кислотой, преобразуя токсичный свободный билирубин в нетоксичный связанный. В норме в промоторной области содержится 6 TA повторов. Увеличение числа повторов приводит к аутосомно-рецессивному заболеванию, которое известно, как синдром Жильбера. Наиболее часто при данном синдроме выявляется мутация 7TA/7TA в гомозиготном состоянии. Хотя синдром считается доброкачественным, он может осложнять течение ряда заболеваний и является фактором риска появления камне в желчном пузыре.

Цель работы. Целью нашей работы являлось изучение частоты мутаций в гене *UGTR1* у детей с непрямым гипербилирубинемией.

Материалы и методы исследования. Был проведен молекулярно-генетический анализ 52 пациентов в возрас-

те от 6 до 16 лет с признаками общей гипербилирубинемии (выше референсного значения 20 мкмоль/л, средний уровень 29 мкмоль/л) за счет непрямой фракции (с нормальным уровнем прямого билирубина). Геномная ДНК выделялась с использованием набора Реал-бест генетика экспресс. Число повторов в промоторной области гена *UGTR1* анализировалось методом ПЦР в реальном времени с анализом кривых плавления целевых ампликонов набором Реалбест-Генетика *UGTR1*. Статистические расчеты были выполнены с помощью компьютерной программы STATISTICA 6.0.

Результаты. Проведенный нами анализ выявил мутацию 7TA в гомозиготном состоянии у 27 пациентов из 52 (51 %) (средний уровень общего билирубина 34 мкмоль/л). У 19 пациентов было выявлен гетерозиготный генотип *UGTR1* 6TA/7TA (средний уровень общего билирубина у данных пациентов был ниже и составлял 25,5 мкмоль/л). У 8 пациентов был выявлен нормальный генотип 6TA (средний уровень общего билирубина 23,5 мкмоль/л).

Выводы. Наше исследование подтверждает, что мутации в промоторной области гена *UGTR1*, ассоциированные с синдромом Жильбера, являются наиболее частой генетической причиной повышения непрямого билирубина у детей. Поэтому при наличии стойкого повышения билирубина за счет непрямой фракции, в первую очередь, необходимо проводить молекулярно-генетический анализ числа повторов в гене *UGTR1*.

DEPDC5 — СЕМЕЙНАЯ ФОКАЛЬНАЯ ЭПИЛЕПСИЯ (КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ)

Кожанова Т.В.^{1,2}, Жилина С.С.^{1,2}, Сушко Л.М.¹, Осипова К.В.¹, Крапивкин А.И.¹, Заваденко Н.Н.²

¹ ГБУЗ «Научно-практический центр специализированной медицинской помощи детям имени В.Ф. Войно-Ясенецкого Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ НПЦ спец.мед.помощи детям ДЗМ), Москва, Россия;

² ФГАОУ ВО Российский научно-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ), Москва, Россия

Актуальность. Фокальная эпилепсия является наиболее распространенным типом эпилепсии, на долю которой приходится 60–70% всех случаев данной патологии. Патогенные варианты нуклеотидной последовательности в гене *DEPDC5* ассоциированы с семейной фокальной эпилепсией с переменными очагами, аутосомно-доминантной гипермоторной эпилепсией, связанной со сном, семейной мезиальной и латеральной височной эпилепсией, доброкачественной эпилепсией с центрально-темпоральными спайками и инфантильными спазмами.

Цель. Описание семейного случая фокальной эпилепсии, ассоциированной с вариантом нуклеотидной последовательности в гене *DEPDC5*.

Материалы и методы. Клиническое и диагностическое обследование (видео-ЭЭГ, МРТ головного мозга), полноэкзомное секвенирование.

Результаты. В ПНО ГБУЗ «НПЦ спец мед помощи детям ДЗМ» наблюдалась девочка 10 лет с диагнозом фокальная эпилепсия. Росла и развивалась без особенностей. Наблюдается неврологами с сентября 2018 г, когда в течение 3 месяцев, частотой около 2 раз в неделю возникали фокальные приступы: билатеральные тонические с неперсисивным поворотом головы и глаз влево, длительностью 1-2 минуты. Затем, возникла спонтанная ремиссия, в связи с чем, противосудорожная терапия не проводилась. С ноября 2021г приступы возобновились, приобрели билатеральный тонико-клонический характер. В терапию введен лаксамид 150 мг/сут — приступы более не повторялись. На момент осмотра в возрасте 10 лет: лицевых и скелетных дизморфий нет. В неврологическом статусе очаговой симптоматики нет, развитие соответствует возрасту. МРТ головного мозга: структурной патологии не выявлено. ВЭЭГ: зарегистрировано периодическое региональное замедление и региональная эпилептиформная активность

в левой лобно-центральной области. При информированном согласии родителей проведено полноэкзомное секвенирование. Выявлен гетерозиготный вариант нуклеотидной последовательности в 14 интроне (сайт сплайсинга) гена *DEPDC5* (с.946+1G>A, NM_014662.5). Проведена ДНК диагностика методом секвенирования по Сенгеру, данный вариант в гене *DEPDC5* подтвержден у пробанда и выявлен у отца. Отец пробанда 1983 г. р. наблюдается неврологом с диагнозом фокальная эпилепсия с 5 лет. С учетом фармакорезистентного течения, отец в 31 г. был обследован как кандидат на хирургическое лечение эпилепсии. По данным ВЭЭГ — регистрируется эпилептиформная активность в правой и левой височных областях (доминантный очаг справа). МРТ головного мозга: изменение по типу ФКД. Проведена селективная амигдалогиппокампэктомия справа. В настоящее время у отца приступы сохраняются 3-5 раз в месяц. В неврологическом статусе: очаговой симптоматики нет, отмечаются мнестические нарушения.

Заключение. Данный клинический случай подтверждает, что патогенные варианты в гене *DEPDC5* ассоциированы с семейной фокальной эпилепсией, клиническое проявление которой может зависеть от типа выявленной мутации. В сравнении с зарегистрированными в мире случаями нами представлена семья, несущая мутации сплайсинга с рефрактерной эпилепсией у пробанда и пороком развития головного мозга в виде ФКД с отсутствием эффекта от хирургического лечения у отца. Изучение генотип-фенотипических корреляций необходимо для решения вопроса о назначении терапии, в том числе и хирургической коррекции и оценки прогноза у пациентов с эпилепсией, связанной с вариантами в гене *DEPDC5*. При принятии решения о хирургии эпилепсии необходимо проведение генетического тестирования методом массового параллельного секвенирования.

ПОТЕРЯ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ ГЕНОВ *SDHX* ПРИ КАРОТИДНЫХ ПАРААНГЛИОМАХ

Маркова Д.С.^{1,2}, Аюпова А.Ф.¹, Ланцова М.С.^{1,2}, Федорова М.С.¹, Павлов В.С.¹, Снежкина А.В.¹, Кудрявцева А.В.¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия

² Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (МГУ), Москва, Россия

Актуальность. Каротидные параангиомы (КПА) — это редкие нейроэндокринные опухоли головы и шеи, формирующиеся из каротидного гломуса, располагающегося в области бифуркации сонной артерии. КПА относятся к злокачественным опухолям с переменным потенциа-

лом метастазирования, который невозможно предсказать. Эти опухоли представляют серьезную проблему для диагностики и терапии. До 40% параангиом головы и шеи ассоциированы с наследственными мутациями в генах предрасположенности, преимущественно *SDHx*, кодирую-

щих субъединицы сукцинатдегидрогеназы. Гены *SDHx* могут функционировать как гены-супрессоры опухолевого роста (TSG); согласно мутационной теории канцерогенеза, для инактивации TSG необходимо чтобы произошла одновременная потеря обоих аллелей гена. При КПГ, потеря первой копии генов *SDHx* часто происходит в результате герминальной мутации, в то время как потеря второго аллеля гена может быть вызвана разными соматическими нарушениями, такими как делеция, потеря хромосомы, точечная мутация, гиперметилирование промотора и др. Исследование механизмов инактивации генов *SDHx* при КПГ необходимо для понимания драйверных генетических нарушений, ассоциированных с развитием опухоли.

Цель исследования — провести анализ потери гетерозиготности (LOH) генов *SDHx* у пациентов с *SDHx*-ассоциированными КПГ.

Материалы и методы. Исследуемая выборка включала 40 опухолевых образцов и парных нормальных тканей (кровь/лимфатический узел), полученных от пациентов с КПГ, имеющими мутации в генах *SDHx*. Анализ LOH проводился с использованием динуклеотидных микросателлитных маркеров, располагающихся в локусах генов *SDHA* [5p15.33], *SDHB* [1p36.13], *SDHC* [1q23.3] и *SDHD* [11q23.1]: *D5S2488* [5p15.33], *D5S392* [5p15.33], *D5S417* [5p15.33], *D1S228* [1p36.21], *D1S507* [1p36.21], *D1S436* [1p36.21], *D1S199* [1p36.13], *D1S305* [1q21.2], *D1S196* [1q24.2], *D1S431* [1q24.2], *D11S1339* [11q22.1], *D11S927* [11q22.3], *D11S5030* [11q23.1] и *D11S1347* [11q23.1]. Для проведения анализа использовали наборы праймеров, включающие прямые

праймеры с флуоресцентной меткой на 5'-конце и немеченные обратные праймеры (Синтол, Россия). ПЦР проводили с использованием полимеразы Tertsus (Евроген, Россия) на термоциклере T100 (Bio-Rad, США). Фрагментарный анализ ампликонов выполняли на приборе НАНОФОР-05 (Синтол). Для визуализации и анализа LOH использовали программное обеспечение GeneMarker (SoftGenetics, США).

Основные результаты. У пациента с редкой мутацией в гене *SDHA* выявлен LOH в двух исследуемых микросателлитных маркерах, *D5S2488* и *D5S417*, что указывает на потерю аллеля дикого типа гена. Пациенты с мутациями в гене *SDHB* чаще всего характеризовались потерей локусов *D1S507* (75%) и *D1S199* (60%). Один из трех пациентов с мутацией в гене *SDHC* показал сохранение гетерозиготности в области гена, остальные пациенты демонстрировали потерю второй аллели гена. В опухолях с мутацией в гене *SDHD* выявлен частый LOH в области всех исследуемых локусов: *D11S1339* — 83%, *D11S927* — 92%, *D11S5030* — 81% и *D11S1347* — 89%, что свидетельствует о потере аллеля дикого типа гена в большинстве образцов КПГ.

Выводы. Таким образом, нами выявлена частая потеря гетерозиготности генов *SDHx*, указывающая на то, что делеция является преимущественным механизмом потери аллели дикого типа этих генов при КПГ. Ген *SDHD* характеризовался самой высокой частотой LOH микросателлитных маркеров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 21-14-00353. Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Геном» ИМБ РАН (https://www.eimb.ru/ru/ckp/ccu_genome_c.php).

СЛУЧАИ ГЕННОЙ КОНВЕРСИИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ В РОССИЙСКОЙ ВЫБОРКЕ ПАЦИЕНТОВ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА БОЛЕЗНЬ ВИЛЛЕБРАНДА

Чернецкая Д.М.¹, Сурин В.Л.¹, Саломашкина В.В.¹, Пшеничникова О.С.¹, Яковлева Е.В.¹, Лихачева Е.А.¹, Зозуля Н.И.¹, Шабанова Е.С.²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ)

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (СЗГМУ им. И.И. Мечникова)

Введение: Генная конверсия между геном фактора фон Виллебранда (*VWF*) (хромосома 12) и его псевдогеном (*VWFP1*) на хромосоме 22 — это уникальный случай конверсии между участками, расположенными на разных хромосомах. Генная конверсия происходит между частью экзона 28 гена *VWF* и гомологичной ему областью псевдогена. Такие случаи периодически описываются среди пациентов с болезнью Виллебранда.

Цель и задачи: Нашей целью было выявить случаи генной конверсии у пациентов с подозрением на болезнь Виллебранда, оценить частоту встречаемости таких изменений и связать найденные дефекты с симптомами болезни.

Материалы и методы: В данное исследование было включено 64 пациента с подозрением на болезнь Вилле-

бранда. ДНК выделяли из периферической крови классическим методом фенольной экстракции. Экзон 28 и гомологичный ему участок псевдогена исследовали методом Сэнгера с помощью разработанных в нашей лаборатории специфических систем праймеров. В качестве референсов были использованы последовательности из GeneBank NCBI: *NG_009072.1* для гена *VWF* и *M60676.1* для псевдогена.

Основные результаты: Из 64-х пациентов замены, характерные для псевдогена, в экзоне 28 гена *VWF* были обнаружены у двоих (пациенты А и Б). У пациента А найдены три замены в гетерозиготном состоянии в подверженной конверсии области экзона 28: две несинонимичные (p.Pro1266Leu, p.Val1279Ile) и одна синонимичная (c.3789G>A). Семейный анализ показал, что все замены

локализованы на одном аллеле. У матери пациента наблюдались те же замены и такие же симптомы болезни Виллебранда. У сына пациента А таких замен найдено не было, как и не было симптомов болезни. В случае пациента Б были обнаружены две замены в гетерозиготном состоянии в зоне конверсии: Val1229Gly и Asn1231Thr. Семейный анализ для данного пациента был невозможен.

Согласно базе мутаций HGMD, патогенные варианты пациента А ассоциированы с типом 1 болезни Виллебранда, что не противоречит данным истории болезни пациента. Варианты, выявленные у пациента Б, имеют противоречивую трактовку.

Участки псевдогена, гомологичные экзону 28, были проанализированы для пациентов А и Б, а также для матери пациента А и пяти контрольных пациентов без генной конверсии. Псевдоген пациента Б соответствовал референсу, а псевдоген пациента А и его матери отличался от него четырьмя заменами, но их позиции не соответствовали варианту симметричного обмена участками между геном и псевдогеном. Кроме того, у матери пациента А все четыре

замены были в гомозиготном состоянии, из чего следует, что они скорее всего являются полиморфными вариациями псевдогена. У всех пяти пациентов контрольной группы последовательности псевдогена на участке гомологичному экзону 28 были идентичны и совпадали с референсом.

Механизм генной конверсии в представленных случаях неясен, потому что у пациента А псевдоген содержит замены, нехарактерные ни для гена, ни для псевдогена, а у пациента Б последовательность псевдогена соответствует референсу и не содержит изменений на участке, где может происходить конверсия.

Выводы: Частота встречаемости генной конверсии в нашей выборке пациентов (N=64) составила 3,13% (N=2). У пациентов А и Б, генная конверсия повлекла появление патогенных вариантов, ассоциированных с легкой формой болезни Виллебранда. Наши данные не подтверждают симметричный обмен участками между геном и псевдогеном, как возможный механизм конверсии, но и не опровергают его. Для решения этого вопроса необходимо исследовать биоматериал от пациента с конверсией *de novo*.

ДИАГНОСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭПИЛЕПСИИ У ДЕТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Даниленко Н.Г.¹, Куликова С.Л.², Иванова А.С.³, Александрович В.В.¹, Сивицкая Л.Н.¹, Синявская М.Г.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² РНПЦ Неврологии и нейрохирургии МЗ Беларуси, Минск, Беларусь

³ Novel Software Systems (Novel), Новосибирск, Россия

Актуальность. Эпилепсия является одним из наиболее распространенных неврологических расстройств, характеризующимся повторяющимися спонтанными вспышками гиперактивности нейронов, известными как припадки (приступы). Распространенность эпилепсии среди детского населения в Республике Беларусь составляет в среднем 2,4 случая на 1000 человек, т.е. порядка 4000 детей в стране страдают эпилепсией, при этом почти половина из них наиболее вероятно имеет генетическую детерминацию. Молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе фармакорезистентной эпилепсии, очень разнообразны и могут быть связаны с генами, кодирующими субъединицы ионных каналов, рецепторы и переносчики различных нейротрансмиттеров, а также с генами, принимающими участие в регуляции транскрипции, ремоделировании хроматина и других молекулярно-генетических процессах.

Цель и задачи. Целью работы было установление генетической причины эпилепсии для группы пациентов на основании разработанных клинико-генетических критериев. Задачами исследования являлось проведение секвенирования клинического экзона, биоинформатическая обработка данных, поиск патогенных вариантов и проведение сегрегационного анализа для каждого из выявленных вариантов нуклеотидной последовательности.

Материалы и методы. Фенол-хлороформной экстракцией получена ДНК пациентов, соответствующая требованиям, предъявляемым при проведении массового

параллельного секвенирования. Секвенирование клинического экзона проводилось на приборе NextSeq 550 (Illumina Inc., USA) с использованием коммерческой панели TruSight One Expanded Sequencing Panel (Illumina Inc., USA), охватывающей более 6700 генов. Пробоподготовка проведена с Illumina DNA Prep with Enrichment (Illumina Inc., USA).

Биоинформатический анализ массива данных NGS выполнен с помощью DRAGEN Enrichment, DRAGEN CNV BaselineBuilder на референсный геном NCBIbuild37 (UCSChg19). Аннотация осуществлена с помощью программного обеспечения Annotvar с использованием баз данных RefGene, InterVar, NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), gnomAD, 1000 Genomes Project, REVEL, ClinVar, dbSNP, dbNSFP.

Верификация обнаруженных вариантов нуклеотидной последовательности проводилась с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру.

Основные результаты. Проведен отбор пациентов, взятие проб, выделение ДНК и экзомное секвенирование с последующей биоинформатической обработкой данных 40 пациентов (53% жен. пол, 47% муж. пол), страдающих фармакорезистентной эпилепсией, в возрасте от 2 до 17 лет (M = 10.2; SD = 4.25). Выполнен анализ аннотированных данных и поиск потенциально патогенных вариантов.

Всего за время исследования для 17 пациентов (43%) подтверждена генетическая причина эпилепсии после выполнения сегрегационного анализа и установления клинического значения выявленных генетических вари-

антов. Обнаруженные варианты локализованы в генах, кодирующих субъединицы ионных каналов *SCN1A*, *CACNA1A*, *KCNQ2*, *KCNQ3*, а также генах, принимающих участие в синаптической передаче *SLC6A1*, *GABRA1*, *STXBP1*, регуляции транскрипции *SRCAP*, *MECP2*, аутофагии *WDR45*, ремоделировании хроматина и эмбриогенеза *CDKL5* и др.

По структуре большинство вариантов представлены однонуклеотидными вариантами (миссенс и нонсенс), также встречаются делеции экзонов в пределах одного гена (в случаях с *MECP2*, *CDKL5*) и микроделеции (15q11-q13 и 13q34).

Большая часть патогенных и вероятно патогенных вариантов возникла *de novo*, однако в 1 случае вариант унаследован от одного из родителей.

Выводы. У исследованной группы детей и подростков в 40% случаев найдены генетические причины

эпилепсии, которые подтверждают разнообразие биохимических дефектов, приводящих к заболеванию, и в определенной степени облегчают разработку терапевтического алгоритма для пациентов. Адекватная терапия в ряде случаев позволит избежать развития болезни по наиболее тяжёлому пути.

Генетическое тестирование следует рассматривать как исследование первой линии для пациентов с эпилепсией, особенно в тех случаях, когда заболевание дебютирует в раннем возрасте и наблюдается фармакорезистентность. Оно позволяет определять механизм развития патологии, прогнозировать ее течение и риски развития осложнений, провести выбор стратегии терапии пациентов.

Работа выполнена в рамках задания 12 подпрограммы «Инновационные биотехнологии» ГП «Научноёмкие технологии и техника» на 2021 — 2025 годы.

ТРЕХПРАЙМЕРНАЯ ПЦР В ДИАГНОСТИКЕ МИОТОНИЧЕСКИХ ДИСТРОФИЙ

Гусина А.А., Марникова Д.П. Мясников С.О.

Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Беларусь

Актуальность. Миотонические дистрофии (МД) — представляют наиболее частые наследственные мышечные дистрофии, манифестирующие у взрослых пациентов. Клинические проявления этих заболеваний включают прогрессирующую миопатию, миотонию, кардиальные проявления, катаракту, эндокринные и когнитивные нарушения. Выделяют две формы — МД 1 и 2 типа. Обе болезни наследуются по аутосомно-доминантному типу и являются болезнями экспансии. МД1 обусловлена увеличением числа триплетов CTG в 3'-нетранслируемой области гена *DMPK* на хромосоме 19, а МД2 — возрастанием количества повторов CCTG в интроне 1 гена *ZNF9* на хромосоме 3. Выявление экспансии в этих генах является сложной задачей, поскольку развитие заболевания может быть обусловлено очень большим числом повторов, что препятствует амплификации и визуализации мутантного аллеля.

Цель исследования: оценить эффективность использования трехпраймерной ПЦР в диагностике миотонических дистрофий.

Материалы и методы. В качестве материала для молекулярно-генетического исследования использовали образцы ДНК 154 пациента с клиническими проявлениями МД из 93 семей. В этой группе 75 пациентам ранее была проведена диагностика МД1 с помощью классической ПЦР и ПЦР длинных фрагментов, что позволило верифицировать диагноз МД1 у 12 из них. В рамках настоящего исследования поиск экспансии CTG повторов в гене *DMPK* и CCTG повторов в гене *CNBP (ZNF9)* был выполнен поэтапно с применением классической ПЦР для детекции коротких аллелей (1-ый этап диагностики), трехпраймерной ПЦР для выявления экспансии (2-ой этап диагностики), а также ПЦР длинных фрагментов (уточнение данных,

полученных трехпраймерной ПЦР). Для всех реакций ПЦР были использованы праймеры, меченные флуоресцентными метками. Результаты ПЦР оценивались методом фрагментного анализа на приборе 3500 Genetic Analyzer.

Результаты и обсуждение. При исследовании образцов ДНК 75 пациентов, ранее обследованных в отношении МД 1 типа, с использованием трехпраймерной ПЦР наличие экспансии в гене *DMPK* было подтверждено во всех ранее известных случаях, а также дополнительно было обнаружено еще у 5 лиц из этой группы. Таким образом, аналитическое превосходство трехпраймерной ПЦР в отношении выявления экспансии CTG повторов в 3'-некодируемой области гена *DMPK* в сравнении с ПЦР длинных фрагментов составило 29,4%.

В результате поиска экспансии CTG повторов в гене *DMPK* и CCTG повторов в гене *CNBP (ZNF9)* в группе из 154 пациентов с симптомами МД с применением комплекса молекулярно-генетических методов, включая трехпраймерную ПЦР, увеличение числа CTG повторов в гене *DMPK* гетерозиготном состоянии выявлено у 35 обследованных из 17 семей. В том числе было диагностировано 4 случая врожденной МД1 в 3 семьях. В одной семье у ребенка с врожденной МД1 и у его матери наблюдалось редкое сочетание экспансии в гене *DMPK* в гетерозиготном состоянии и премутации в гене *CNBP (ZNF9)* в гетерозиготном состоянии. Экспансия CCTG повторов в гене *CNBP (ZNF9)* обнаружена у 9 пациентов из 6 семей, у двух пациентов из одной семьи отмечено увеличение числа повторов CCTG повторов в гене *CNBP (ZNF9)*, соответствующее состоянию премутации. Во всех случаях для квалификации экспансии повторов в гене *CNBP (ZNF9)* как премутации, потребовалось выполнение ПЦР длинных фрагментов, т.к. эти аллели не

Раздел 11. НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ И ВИЧ-АССОЦИИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИЙ

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ ЭПИДЕМИИ ВИЧ/СПИД В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ. НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДАВНОСТИ ЗАРАЖЕНИЯ И МИНИМИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ

Шемшура А.Б.^{1,2}, Лебедев П.В.^{1,2}, Кулагин В.В.^{1,2}, Хотелева Л.В.¹, Топольская С.В.¹, Чудайкина Н.Н.¹, Шемшура Т.А.³, Шлыкова А.В.⁴, Кириченко А.А.⁴, Киреев Д.Е.⁴

¹ ГБУЗ Клинический центр профилактики и борьбы со СПИД министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, Россия.

² ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, Краснодар, Россия

³ ГБУЗ Специализированная клиническая инфекционная больница министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, Россия.

⁴ ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Введение. После снижения заболеваемости ВИЧ-инфекцией в 2020 г. (обусловленного, во многом, ограничением доступности скрининговых исследований на ВИЧ в условиях пандемии COVID-19), в 2021-2022 гг. на фоне растущих объемов обследования населения отмечена отчетливая тенденция к росту числа вновь выявляемых случаев ВИЧ-инфекции, как в целом по России, так и в Южном федеральном округе и Краснодарском крае [1, 2, 3]. Что стоит за возобновлением тенденции к продолжению эпидемии? Почему, несмотря на достижение планового уровня почти всех целевых показателей “Государственной стратегии противодействия распространению ВИЧ-инфекции в Российской Федерации...” [4], не удается достичь устойчивого снижения основного индикатора — числа новых случаев инфицирования ВИЧ?

Цель и задачи. Представлялось актуальным изучить возможность использования нового алгоритма определения давности инфицирования и результатов мониторинга лекарственно устойчивых вариантов ВИЧ с целью совершенствования системы противодействия эпидемии ВИЧ/СПИД в Краснодарском крае.

Материалы и методы. У 975 жителей Краснодарского края с впервые полученным в 2021 году положительным результатом иммунного блота, была определена давность инфицирования ВИЧ с применением алгоритма, основанного на исследовании особенностей антителогенеза в ИФА (т/с «ДС-ИФА-ВИЧ-АТ-СРОК» (ООО “НПО “Диагностические системы”, Нижний Новгород, Россия) [5]. У 171 пациента из числа лиц с давностью инфицирования менее 9 месяцев, была получена нуклеотидная последовательность фрагмента гена *pol* (2253–3369 п.н.) методом секвенирования по Сэнгеру (т/с «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, Россия).

Основные результаты. Анализ полученных данных показал, что из всех обследованных пациентов около четверти (260 чел. из 975 (26,7%)) инфицировались ВИЧ менее 9 мес. назад от момента обследования. Преобладание лиц с длительным стажем заболевания среди вновь выявленных пациентов, косвенным образом подтверждается значительной (55%) долей боль-

ных с признаками иммуносупрессии (CD4<500 кл/мкл) среди впервые взятых на диспансерный учет в 2021 г. На основе полученных результатов исследований давности заражения, была проведена верификация реального уровня заболеваемости ВИЧ-инфекцией в 2021 г. в Краснодарском крае согласно методике Рабочей группы ВОЗ/ЮНЭЙДС [6]. Полученный по итогам расчетов показатель ($32,1 \pm 4,3$ на 100 тыс. нас.) оказался на 11,3% ниже официально зарегистрированного (36,2 на 100 тыс. нас.).

Более полное выявление недавно инфицированных АРТ-наивных пациентов в Краснодарском крае и увеличение их охвата секвенированием позволило повысить репрезентативность мониторинга за распространением лекарственно-устойчивых вариантов ВИЧ. Охват АРТ больных, состоящих на диспансерном наблюдении, продолжал увеличиваться: с 72% в 2019 г. до 84% в 2022 г. Соответственно возрастало и число больных с длительным стажем терапии. Интенсивные миграционные потоки в Краснодарском крае из сопредельных стран и регионов России с высокой распространенностью ВИЧ-инфекции (в 2021 г. на территорию края прибыло 1 229 ВИЧ-инфицированных лиц из других субъектов РФ, а также 98 чел. ВИЧ-позитивных иностранных граждан) и перебои в обеспечении инфицированных мигрантов антиретровирусными препаратами повышают вероятность заноса и дальнейшего распространения лекарственноустойчивых вариантов ВИЧ.

Проведенный на этом фоне анализ результатов секвенирования вариантов ВИЧ от недавно инфицированных пациентов с использованием модуля CPR базы данных Стэнфордского университета (<https://hivdb.stanford.edu/cpr/>) подтвердил наметившуюся ранее тенденцию расширения циркуляции резистентных форм вируса: частота их обнаружения возросла с 7,0% в 2018-2019 гг. до 14,1% в 2021 г. Наиболее часто передавались мутации гена *pol* ВИЧ, обуславливающие резистентность к ННИОТ (8,2%), несколько реже к ИП (4,1%) и к НИОТ (1,8%). В случае последующего подтверждения столь частого (более 10%) инфицирования пациентов на территории края лекарственноустойчивыми штаммами ВИЧ, в алгоритм обследования при постановке на диспансерный учет необходимо

будет включить обязательное определение резистентности вируса перед началом лечения, а также использовать результаты указанных исследований при формировании спектра закупаемых АРВП. Для выявления и последующего прерывания путей распространения резистентных вариантов ВИЧ на территории края целесообразна организация широких комплексных исследований по эпидемиологическому надзору с помощью анализа кластеров их передачи.

Выводы. Таким образом, использование новых диагностических технологий определения давности заражения и молекулярно-эпидемиологического мониторинга за циркулирующими вариантами ВИЧ позволило сформировать предпосылки для дальнейшего повышения эффективности противодействия распространению ВИЧ-инфекции в Краснодарском крае. Необходимо продолжение и расширение указанных исследований на регулярной основе для своевременной объективной оценки и оптимизации проводимых мероприятий.

Список литературы:

1. Ладная Н.Н. Применение методов молекулярной диагностики в эпидемиологическом надзоре за ВИЧ-инфекцией

// Материалы конгресса с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность-2023», Москва, 27-28 апреля 2023, <http://mdb2023.ru>.

2. Информационный бюллетень: «ВИЧ-инфекция на Юге России за 2022 год», Ростов-на-Дону, 2023 // <https://www.niiimp.ru/news/informacionnyy-byulleten-vich-infekciya-na-yuge-rossii-za-2022-god>.

3. Справка об эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции в Краснодарском крае в 2022 году. // <http://www.hivkuban.ru/statistics/>

4. Государственная стратегия противодействия распространению ВИЧ-инфекции в Российской Федерации на период до 2030 года, М., 2020 // <http://government.ru/docs>.

5. Шлыкова А.В. и соавт. Оценка эффективности алгоритма выявления случаев недавнего инфицирования ВИЧ-1 в Российской Федерации. // *Инфекционные болезни.* 2021; 19(2): 37–50. DOI: 10.20953/1729-9225-2021-2-37-50.

6. Using recency assays for HIV surveillance: 2022 technical guidance, World Health Organization, Geneva, 2022 // <https://www.who.int/publications/i/item/9789240064379>

МЕТОД ОЦЕНКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ ВИЧ В КЛЕТКЕ С ПОМОЩЬЮ ПАРАМЕТРОВ ТЕКСТУРЫ ХАРАЛИКА И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ

Елфимов К.А.^{1,2}, Готфрид Л.Г.¹, Гашникова М.П.¹, Бабошко Д.А.^{1,2}, Гашникова Н.М.¹

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия

² Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

Актуальность. ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, геном которого содержит ≈9-10 тыс. пар нуклеотидов положительно-смысловой РНК+ и 9 генов, кодирующих 15 белков. Все эти белки можно разделить на две группы: ранние регуляторные, моделирующие метаболизм и противовирусный ответ клетки-хозяина, и поздние структурные белки, входящие в состав вириона.

В некоторых случаях может потребоваться определение пространственного распределения белков ВИЧ в клетке, например, при исследовании перестройки цитоскелета, формирование вирусных или иммунологических синапсов, определения мест сборки вирионов и т.д. Обычно для этих целей используются визуальный осмотр препаратов методом микроскопии, однако такой метод имеет низкую точность и занимает много времени. В связи с данной проблемой была поставлена цель исследования — определить возможность использования точных параметров текстуры Харалика для оценки распределения белков ВИЧ в клетке.

Материалы и методы.

Клеточная культура

В работе использовалась иммортализованная клеточная культура МТ-4, чувствительная к ВИЧ.

Моделирования ВИЧ-инфекции

Инфицирование клеток культуры МТ-4 проводилось штаммом ГКВ-4046 ВИЧ-1.

Окрашивание клеток

В качестве мишени был использован структурный белок вириона р24 ВИЧ. Окрашивание производилось антителами, конъюгированными с FITC.

Получение и анализ изображений

С целью получения микрофотографий инфицированных клеток использовался проточный цитометр с визуализацией Amnis FlowSight (объектив 20x). Анализ изображений проводился в ПО IDEAS 6.2.

Результаты. Изображения для анализа представляли собой окрашенные антителами микрофотографии клеток, выполненные на 5 сутки после инициации ВИЧ-инфекции.

Для оценки распределения сигнала от внутриклеточного р24 ВИЧ использовались параметры Харалика, доступные в ПО IDEAS 6.2: корреляция (оценивает схожесть интенсивности сигнала в соседних пикселях), энтропия (оценивает случайность распределения интенсивностей на изображении), однородность (сравнивает схожесть пикселей в области клетки; если в изображении много одинаковых пикселей — значит сигнал распределен равномерно), дисперсия (оценивает разброс значений яркости пикселей; изображения с высокой дисперсией будут содержать очень яркие и очень темные участки).

При визуальном осмотре изображений можно было заметить, что в части клеток находятся участки с большей интенсивностью сигнала FITC, чем в среднем по области клетки. Данные локации, как правило, находились

недалеко от внутренней границы цитоплазматической мембраны; факт их наличия объясняется локализацией сборки или отпочковывания вирусных частиц ВИЧ. Однако, были и клетки, в которых сигнал был распределен равномерно, возможно, в данных инфицированных клетках

низкая активность сборки и отпочковывания вирионов. Чтобы подтвердить или опровергнуть визуальные наблюдения использовался компьютерный анализ изображений с использованием параметров Харалика, который подтвердил результаты визуального осмотра (Таблица 1).

ТАБЛИЦА 1. РАЗДЕЛЕНИЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПО ПАРАМЕТРАМ ТЕКСТУРЫ ХАРАЛИКА

Название популяции клеток	Доля от общего числа инфицированных клеток	Описание популяции
Клетки с большим количеством скоплений p24 ВИЧ	8,5%	Клетки с большим количеством точек высокой интенсивности сигнала p24/FITC и низкими значениями флуоресценции в других областях цитоплазмы.
Клетки с небольшим количеством скоплений p24 ВИЧ	28,5%	Клетки с небольшим (1-2) количеством точек высокой интенсивности сигнала p24/FITC и средними значениями флуоресценции в других областях цитоплазмы.
Клетки без выраженных скоплений p24 ВИЧ	63%	Клетки без локальных скоплений сигнала от p24/FITC. Флуоресценция равномерно распределена в границах цитоплазмы клетки.

Выводы.

1. Инфицированная часть клеточной популяции МТ-4, зараженной штаммом ГKB-4046 ВИЧ-1, может быть разделена по характеру распределения белка p24 ВИЧ: он может быть частично или полностью сконцентрирован у границ цитоплазматической мембраны (сборка и отпочковывание вирионов), а может быть равномерно распределен по цитоплазме клетки (этап трансляции).

2. Параметры текстуры Харалика (корреляция, энтропия, однородность, дисперсия) могут быть использованы для точного разделения популяции инфицированных ВИЧ клеток по распределению интенсивности сигнала от окрашенных вирусных белков.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ВИЧ, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ РАЗЛИЧНОГО БИОМАТЕРИАЛА

Панова А.Е., Винокуров А.С., Пай Г.В., Казюлина А.А., Байбеков К.С., Веселова Е.В., Васильева И.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение: ВИЧ-инфекция остается одной из глобальных проблем мирового здравоохранения. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на 2022 год около 39 миллионов человек заражены вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). В год заражается порядка 1,5 миллиона человек, из них 26% заражаются вариантами ВИЧ, резистентными к антиретровирусным препаратам первой линии. Определение резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам (АРВП) позволяет у конкретного больного провести коррекцию лечебных мероприятий, а в рамках осуществления эпиднадзора — получить информацию о циркулирующих генетических вариантах ВИЧ и распространенности его резистентных форм. Тест-системы для исследования резистентности ВИЧ позволяют провести анализ РНК ВИЧ, содержащейся в плазме крови, другие виды биоматериала для исследования не рекомендованы. Вместе с тем, литературные данные показывают, что в организме человека существует так называемый «архив» вариантов ВИЧ с мутациями и возможны различия молекулярно-генетического профиля ВИЧ, выделенного из плазмы крови и других видов биомате-

риала. Молекулярно-генетический профиль ВИЧ, выделенный из различных видов биоматериала, изучен недостаточно и представляет большой научно-практический интерес.

Цель и задачи: Провести сравнительный анализ молекулярно-генетического профиля ВИЧ, выделенного из плазмы крови и других видов биоматериала

Материалы и методы: В исследование были включены 19 больных ВИЧ-инфекцией, у которых молекулярно-генетическое исследование ВИЧ было проведено из нескольких видов биоматериала. У 10 больных из плазмы крови и ликвора, у 7 больных из плазмы крови и биоптата лимфатического узла, у 1-го больного из плазмы крови, биоптата лимфатического узла и ликвора и у 1-го больного из плазмы крови, ликвора и пунктата костного мозга.

Исследовали биоматериал с вирусной нагрузкой ВИЧ более 500 копий/мл. Выделение РНК ВИЧ из плазмы и ликвора осуществляли реагентами, входящими в набор «ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0»(Abbott) в соответствии с инструкцией производителя. Из биоптатов лимфатических узлов РНК ВИЧ выделялась с помощью набора RNeasy Mini kit(QIAGEN,

Германия) согласно инструкции. Определение вирусной нагрузки ВИЧ выполнялось с использованием ПЦР тест-системы «РеалБест РНК ВИЧ» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Очистку продуктов сиквенсовой ПЦР от невключившихся терминаторов проводили с помощью комплекта реагентов BigDye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, США). Секвенирование амплифицированных фрагментов гена *pol* ВИЧ (участок гена протеазы с 1 по 99 кодоны и гена обратной транскриптазы с 1 по 335 кодон) проводили на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США), с использованием коммерческого набора «ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0» (Abbott, США). Анализ данных секвенирования и получение консенсусной последовательности проводили с использованием программного обеспечения «ViroseqHIV-1 Genotyping System Software v3.0» (Celera, США). Анализ мутационного профиля ВИЧ, определения генетического варианта и устойчивости к АРВП проводили с помощью on-line программы «HIValg Program: Mutations Analysis» Стэнфордского университета (<https://hivdb.stanford.edu>).

Основные результаты: Вирусная нагрузка ВИЧ отличалась в разных видах биоматериала. Для ликвора количество ВИЧ составляло: от $6,4 \cdot 10^2$ до $1,5 \cdot 10^6$ копий/мл, для плазмы крови: от $8 \cdot 10^2$ до $6 \cdot 10^6$ копий/мл. Наиболее высокая вирусная нагрузка ВИЧ наблюдалась в биоптатах лимфатического узла: от $1 \cdot 10^4$ до $6,3 \cdot 10^8$ копий/мл, а для пунктата костного мозга нагрузка ВИЧ была наименьшей и составила $2,4 \cdot 10^4$ копий/мл.

Среди генетических вариантов ВИЧ преобладал вариант A (17 из 19 пациентов, 89,48%), по одному случаю был установлен вариант B и смесь варианта A и рекомбинантной формы CRF02_AG (по 1 из 19 больных, 5,26%). Расхождений в генетических вариантах ВИЧ, выделенных из различных видов биоматериала от одного пациента, установлено не было.

Мутации, ассоциированные с резистентностью ВИЧ к АРВП, были выявлены у 8 из 19 больных (42,1%). У 3-х больных была выявлена монорезистентность к нуклеозидным

ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ), у 3-х больных монорезистентность к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ), у 1-го больного была выявлена резистентность ко всем классам препаратов, и еще у 1-го пациента к НИОТ и ННИОТ. Различия в генетическом профиле вируса из разных видов биоматериала были обнаружены у 1-го из 8 больных (12,5%) с резистентностью ВИЧ: в биоптате лимфатического узла были выявлены мутации, ассоциированные с устойчивостью ВИЧ к НИОТ и ННИОТ, в плазме крови у этого пациента мутации вируса не выявлены.

Кроме этого, у 2-х из 19 больных (10,5%) наблюдались различия в выявленных мутациях связь, которых с резистентностью ВИЧ не установлена. У одного больного в ликворе были обнаружены мутации в гене обратной транскриптазы K102KR и N137H, а в плазме крови — не обнаружены. У второго больного в плазме крови определялись две мутации в гене протеазы T74S и V77I, а в ликворе эти мутации не были обнаружены.

Выводы: Сравнительный анализ молекулярно-генетического профиля ВИЧ показал, что имеются расхождения в выявленных мутациях из плазмы крови и других видов биоматериала. Различия установлены как среди мутаций, ассоциированных с резистентностью ВИЧ (у 1 из 8 больных): мутации ВИЧ были обнаружены только в биоптате лимфатического узла, а в плазме крови мутации не были выявлены. Так и в мутациях связь, которых с резистентностью ВИЧ не установлена (у 2 из 19 больных). У одного больного в ликворе были обнаружены мутации в гене обратной транскриптазы, а в плазме крови — не обнаружены. У второго больного — в плазме крови определялись две мутации в гене протеазы, а в ликворе мутации не были обнаружены. Хотя обнаруженные мутации и не связаны с устойчивостью ВИЧ к АРВП, но могут свидетельствовать о различной активности мутационного процесса вируса в разных локусах организма.

ПОРОГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРЕДАЮЩЕЙСЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

Ревизор А.О., Пономарева О.А., Плотникова Ю.К., Шулунов А.А., Черкасов Н.Н., Вершинин П.Е., Наумова Е.С., Кузнецова Е.А., Танхаева А.И., Полякова П.А.

ГБУЗ «Иркутский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Иркутск, Россия

Актуальность. На территории Иркутской области с 2006 года в лечении ВИЧ-инфицированных пациентов активно применяется антиретровирусная терапия (АРТ). На июль 2023 года принимали АРТ 25141 человек, постоянно проживающих в Иркутской области, из них у 1812 обнаружены мутации лекарственной устойчивости (ЛУ), что составляет 7,2%. В свою очередь появление таких вариантов ВИЧ ведет к повышению вирусной нагрузки в организме инфицированного человека и, как следствие, к возможности передачи вируса другим людям. Согласно методическим рекомендациям МР 3.1.5.0075/1-13 по надзору за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам, в регионах, где АРТ активно

применяется более 3-х лет, должны проводиться пороговые исследования по первичной резистентности ВИЧ.

Цель исследования. Определение масштабов передачи и распространения передающейся резистентности к препаратам АРТ среди недавно инфицированных ВИЧ пациентов, не имевших опыта получения АРТ на территории Иркутской области.

Материалы и методы. В работе представлены результаты двух пороговых исследований, проведенных в 2019 и 2023 годах. В обоих исследованиях использовалась плазма крови от 50 ВИЧ-инфицированных лиц, находящихся на диспансерном наблюдении в Иркутском областном Центре СПИД, не имевших опыта АРТ, с предположитель-

ной датой заражения не более одного года и уровнем CD4+ более 500 клеток/мкл на момент исследования. В выборке 2019 года участвовали 28 женщин (56%) и 22 мужчины (44%). Пути передачи ВИЧ: гетеросексуальный контакт — 48 (96%), наркотический контакт — 1 (2%), вертикальный (во время родов) — 1 (2%). В выборке 2023 года участвовали 24 женщины (48%) и 26 мужчины (52%). Пути передачи ВИЧ: гетеросексуальный контакт — 37 (74%), гомосексуальный контакт — 2 (4%), наркотический контакт — 5 (10%), вертикальный (во время родов) — 6 (12%).

Вирусная нагрузка в образцах составляла от 1000 до 1000000 копий РНК/мл. Определение молекулярно-генетического профиля ВИЧ выполняли с помощью коммерческих тест-систем «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» и «ViroSeq HIV-1» (Abbott, США), предназначенных для анализа гена pol, кодирующего ферменты протеазы и обратную транскриптазу. Полученные последовательности генома ВИЧ-1 выравнивали в программе Sequencher (version 4.1.4) в соответствии с вариантом ВИЧ-1 HXB2 (регистрационный номер GeneBank K03455). Множественное выравнивание проводили с при-

менением программы BioEdit (version 7.2.5). Для филогенетического анализа использовали метод «максимального правдоподобия» на основе модели Тамуры-Нэя в программе MEGA 6. Для анализа мутаций и определения профиля резистентности использовалась программа интерпретации мутаций ЛУ HIVdb Program: Calibrated Population Resistance Tool (version 8.1 (2022-07-06)), представленная на сайте Стэнфордского университета (<http://hivdb.stanford.edu>).

Результаты и обсуждение. Мутации передающейся ЛУ были выявлены в образцах от 3 пациентов в 2019 году и от 6 — в 2023 (6% и 12% соответственно).

В выборке 2019 года у двух пациентов (4%) обнаружены мутации ЛУ к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ) и у одного (2%) к ингибиторам протеазы (ИП). Мутаций, вызывающих ЛУ к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ) выявлено не было. В 2023 году были обнаружены следующие варианты с ЛУ: 2 пациента с ЛУ к ИП (4%), 2 — к ННИОТ (4%), 1 — НИОТ+ННИОТ (2%) и 1 — ИП+ННИОТ (2%). Спектр выявленных мутаций представлен в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. МУТАЦИИ ПЕРЕДАЮЩЕЙСЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ (CPR) И ПРОЧИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ, СВЯЗАННЫЕ С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ ВИЧ, ВЫЯВЛЕННЫЕ В ПОПУЛЯЦИИ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

		2019	2023
Мутации ЛУ (CPR)	ИП	M46I (2%)	M46I/L (6%)
	НИОТ	—	L74V (2%)
	ННИОТ	Y181I (2%), K101E (2%)	K101E (2%), K103N/S (6%), G190S (2%), P225H (2%)
Прочие полиморфизмы, связанные с резистентностью	ИП	L10F (2%)	—
	НИОТ	A62V (72%)	A62V (62%), S68G/N (12%), T215L (2%)
	ННИОТ	E138A (16%), V179D (8%), V108I (2%)	E138A (8%), K103R (2%)

Выявленная мутация M46I/L является ИП-отобранной неполиморфной заменой, которая в сочетании с другими мутациями ИП-устойчивости вызывает снижение чувствительности ВИЧ ко всем ИП, кроме дарунавира. Замена L74V приводит к ЛУ высокого уровня к диданозину и среднего уровня к абакавиру. Y181I представляет собой неполиморфную мутацию с заменой двух пар оснований, отобранную невирапином (NVP) и этравиринном (ETR). Она вызывает высокий уровень устойчивости к NVP, ETR и рилпивирину (RPV). K101E является неполиморфной, в основном, дополнительной мутацией, которая вызывает промежуточную устойчивость к NVP и RPV, низкую устойчивость к эфавирензу (EFV) и потенциальную низкую устойчивость к ETR. G190S представляет собой неполиморфную мутацию, придающую высокий уровень устойчивости к NVP и EFV. P225H — это неполиморфная мутация, выбранная EFV, которая обычно возникает в сочетании с K103N. Комбинация P225H и K103N синергически снижает чувствительность к NVP, EFV и DOR.

Прочие полиморфизмы, связанные с резистентностью, широко распространены среди АРТ-наивной популяции. При этом наиболее часто встречающаяся замена A62V является широко распространенным полиморфизмом среди вирусов подтипа А в странах бывшего Совет-

ского Союза, а в других подтипах является неполиморфной мутацией, отобранной НИОТ.

Помимо исследования на ЛУ, был проведен филогенетический анализ полученных последовательностей геномов ВИЧ. В выборке 2019 года один образец кластеризовался с субтипом В (2%), 5 (10%) — с рекомбинантом CRF63_02_A6, остальные 44 образца (88%) типировались как А6. В 2023 году выявлено следующее распределение: А6 — 88%, CRF63_02_A6 — 6%, А1, В, CRF02_AG — по 2% соответственно. Увеличение генетического разнообразия скорее всего связано с усилением миграционной и туристической активности населения между различными регионами.

Заключение. Передающаяся резистентность ВИЧ в Иркутской области на данный момент установилась на значениях в 12% (6% к ИП, 2% к НИОТ, 8% к ННИОТ), что согласно классификации ВОЗ является средним уровнем, и не превышает порог в 15%, после которого необходимо тестирование каждого пациента перед назначением АРТ. Согласно методическим рекомендациям МР 3.1.1.0075/1-13 по надзору за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам, целесообразно провести повторное исследование на передающуюся резистентность через 2 года для оценки динамики распространения резистентных штаммов ВИЧ.

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ОПЫТОМ ПРИЕМА ИНГИБИТОРОВ ИНТЕГРАЗЫ

Монахов Н.Э.^{1,2}, Ермаков А.И.¹, Обижаева Е.С.¹

¹ СПб ГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородиной» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Основной задачей АРТ является максимальное подавление размножения ВИЧ до неопределяемого уровня. Класс антиретровирусных препаратов, содержащих ингибиторы переноса цепей интегразы ВИЧ-1, относится к числу препаратов с высоким генетическим барьером, благоприятным профилем переносимости и рекомендован к назначению терапии первой линии ВИЧ-инфекции, а также для подбора индивидуального режима при формировании лекарственно-устойчивых форм.

Цель: оценить генетические варианты ВИЧ-1 и распространенность мутаций лекарственной устойчивости к ингибиторам интегразы (ИИ) среди получающих антиретровирусную терапию.

Методы. Проведено молекулярно-генетическое исследование образцов плазмы крови у 40 ВИЧ-положительных пациентов с вирусологическим неуспехом текущего режима АРТ на базе СПб ГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» в 2020–2023 гг.

Анализ фрагментов гена *pol*, кодирующего ферменты: протеазу (1–99 АК), обратную транскриптазу (30–265 АК) и интегразу (1–288 АК) выполнен на генетическом анализаторе ABI Hitachi 3500xl («Applied Biosystems Inc.», США) с использованием набора реагентов АмплиСенс® АмплиСенс® HIV-Resist-Seq («ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия) и ViroSeq HIV-1 («Celera Diagnostics», США).

Данные клинико-лабораторного обследования и нуклеотидные последовательности, полученные в результате секвенирования, депонированы в Российскую базу данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам (RuHIV).

Субтипирование ВИЧ проводилось с использованием алгоритмов программ REGA HIV-1 Subtyping Tool Version 3.46. Оценка мутаций ЛУ осуществлялась с помощью базы данных Стэнфордского университета HIVDB Algorithm Version 9.4.1 (2023-06-11).

Результаты. Медиана вирусной нагрузки на дату забора образцов составила — 3,7 lg копий РНК ВИЧ (IQR 3,0–4,3).

Генетическое разнообразие ВИЧ-1 представлено доминирующим субтипом А6 — 85%, субтипом В — 10%, и по 1 случаю варианта субтипа С и рекомбинантной формы CRF63_02A6.

Вирусологическая неэффективность в 45% регистрировалась на схемах АРТ, включавших два нуклеозидных ингибитора обратной транскриптазы (НИОТ) и одного ингибитора интегразы 1 поколения (ИИ, RAL). В 22% применялся нестандартный режим (НР) — сочетание ИИ с препаратами разных групп. Длительность применения схемы на основе ИИ до проведения теста варьировала от 9 до 280 недель

(IQR 30,2–113,9). Установлено, что в 35% случаев повторная вирусемия возникла на терапии второй и третьей линии.

В результате консенсусного анализа ранее проведенных тестов резистентности у пациентов с вирусологическим неуспехом определена ЛУ к одному препарату АРТ в 77,5% случаев, а частота формирования полирезистентности (ИИ+НИОТ+НИИОТ) составила 20%. Среди образцов с восприимчивым вирусом к ИИ обнаруживалась устойчивость ВИЧ к НИОТ и/или НИИОТ у 25% обследуемых. Резистентность ВИЧ одновременно к НИОТ и ИИ определялась в 35% случаев, чаще встречалась одиночная мутация M184V/I, связанная со снижением чувствительности к ЗТС, FTC и ABC.

Мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью (ЛУ) к ИИ, выявлены в 60% образцов. В 52,5% регистрировали надзорные мутации ЛУ в гене фермента интегразы, а комбинация основных (major) и добавочных (accessory) мутаций определялась в 27,5% случаев.

Наиболее часто резистентность ВИЧ к ИИ обуславливалась мутациями: Y143C/R (17,5%), N155H (17,5%), E138K (10,0%), Q148H/K/R (10,0%) и G140S/A (7,5%). Важно отметить, что замена в 143 позиции выбирается обычно у получающих RAL, не снижая восприимчивости вируса к CAB, DTG или BIC. Распространенная неполиморфная мутация N155H вызывала устойчивость высокого уровня к RAL и EVG, а к ингибиторам 2 поколения резистентность низкого и среднего уровня формировалась только в присутствии других мутаций класса ИИ. Сочетание мутаций Q148H/R/K + (E138K ± G140S/A) встречалось в 10% образцов, вызывая высокий уровень потенциальной устойчивости (суммарный балл >60) ко всем ингибиторам интегразы.

Спектр добавочных мутаций ЛУ к ингибиторам интегразы представлен: T97A (17,5%), G163R (7,5%), S230R (7,5%), H51Y (5%), D232N (5%). В 3 образцах идентифицирована только одна полиморфная мутация T97A, неспособная самостоятельно привести к развитию ЛУ, а неуспех терапии был вызван резистентностью к НИИОТ в составе схемы АРТ.

Выводы. Мониторинг лекарственной устойчивости к ингибиторам интегразы имеет важное значение, особенно у пациентов с предшествующей вирусологической неудачей. В результате проведенного анализа установлено, что мутации резистентности к ИИ определялись в 60% случаев. В 47,5% исследуемых образцов чувствительность вируса сохранялась ко всем представителям класса ИИ (мутационный балл ≤14), в том числе при выявлении добавочных мутаций ЛУ. Обнаружение мутаций Q148R/H или N155H в комбинации с другими заменами значительно снижает эффективность ИИ 2 поколения, тем самым затрудняя подбор последующего режима АРТ, особенно у пациентов с множественной лекарственной устойчивостью.

Раздел 12. МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗА — БИОМАРКЕР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПЛЕВРИТОВ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Дьякова М.Е.¹, Владимиров К.Б.², Эсмедляева Д.С.¹, Яблонский П.К.^{1,3}

¹ ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России,

² Санкт-Петербург, Россия

ФГБОУ ВО «Северо-Западный Государственный Медицинский Университет им. И.И.Мечникова» Минздрава России,

³ Санкт — Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Актуальность — Вирус иммунодефицита человека поражает иммунную систему и ослабляет защиту от многих инфекций (в том числе туберкулеза), и некоторых типов рака, с которыми может справиться иммунитет здорового человека. ВИЧ-инфекция вызывает изменения в иммунных клетках, продуцирующих иммуносупрессивный аденозин.

Цель исследования — Оценить информативность определения активности аденозиндезаминазы и аденозиндезаминазы-2 в диагностике туберкулезных плевритов у больных ВИЧ-инфекцией.

Материалы и методы. Ретроспективно обследовано 215 пациентов с плевральным выпотом туберкулезной этиологии (ТП) и 163 пациента — нетуберкулезной этиологии (неТП). В группе «ТП» у 27 пациентов туберкулез был ассоциирован с ВИЧ-инфекцией (ТП/ВИЧ+) и у 188 пациентов — нет (ТП/ВИЧ-). В плевральном выпоте определяли активность общей аденозиндезаминазы (АДА) и ее изоферментов (АДА-1 и АДА-2).

Результаты и их обсуждение. В группе «ТП» активность общей АДА (95,5 [67,7; 115,4] против 82,0 [59,6; 100,0] ед/л, $p=0,1$), АДА-1 (14,2 [5,8; 20,5] против 12,1 [6,1; 23,7] ед/л, $p=0,9$) и АДА-2 (78,1 [38,1; 93,1] против 62,4 [35,4; 82,2] ед/л, $p=0,1$) не зависела от ВИЧ-статуса. Активность данных показателей определялась выше порогового уровня — общая АДА в 96,3% и в 95,2%, АДА-1 в 25,9% и 30,8% и

АДА-2 в 92,6% и 83,3% случаев в группах «ТП/ВИЧ+» и «ТП/ВИЧ-» соответственно. Получена негативная корреляция между активностью АДА-1 и вирусной нагрузкой ВИЧ в группе «ТП/ВИЧ+» ($r=-0,45$; $p=0,008$), а также в подгруппе больных ТП/ВИЧ+, получавших ($r=-0,9$; $p=0,008$) и не получавших АРВТ ($r=-0,47$; $p=0,04$). Таким образом, повышение активности общей АДА у больных туберкулезным плевритом вне зависимости от наличия / отсутствия ВИЧ — инфекции происходит за счет АДА-2.

Заключение. Полученные нами данные свидетельствуют об участии ферментов пуринового метаболизма в патогенезе ВИЧ — инфекции. В то же время, активность аденозиндезаминазы не является специфическим биомаркером индивидуальных изменений, характерных для ВИЧ-инфекции. Результаты исследования позволяют утверждать, что определение активности общей аденозиндезаминазы и аденозиндезаминазы-2 является высоко информативным и диагностически значимым маркером туберкулезного плеврита у ВИЧ-инфицированных пациентов. Информативность определения активности аденозиндезаминазы и аденозиндезаминазы-2 не снижается даже при наличии выраженной иммуносупрессии, что позволяет активно их использовать при проведении диагностических мероприятий и раннем назначении противотуберкулезной терапии.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОВ PE_PGRS MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

В.В. Слизень, Л.К. Суркова

«Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», г. Минск, Республика Беларусь

Приблизительно 10% кодирующей способности генома *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) связано с семейством генов PE (включая PE_PGRS) и PPE, присутствующих только у рода *Mycobacterium*. Белки PE_PGRS кодируются 65 генами (некоторые из них могут быть псевдогенами), располагаются на поверхности или секретируются наружу и обеспечивают ан-

тигенные свойства МБТ. Анализ изменчивости генов PE и PPE позволяет изучить механизмы эволюции и адаптации МБТ.

Цель — изучить изменчивость генов PE/PPE для оценки механизмов эволюционных изменений МБТ.

Материалы и методы. Секвенированы геномы изолятов *M. tuberculosis* 31d и 4860 (код доступа в GenBank,

NCBI — CP110674.1 и CP053092.1 соответственно) с использованием технологии MiSeq, Illumina и MiniOn, Nanopore. Проведен анализ (Excel, Microsoft) содержания нуклеотидов TGA, TAG, TAA, а также CGGC в генах геномов: *M. marinum* (содержание C+G в геноме — 65,6%), *B. mallei* Turkey2 хромосома 2 (69,0%), *M. kansasii* (66,1%), *M. tuberculosis* (65,6%), *M. intracellulare* (67,9%), *N. asteroides* (69,9%), *P. aeruginosa* (66,2%), *A. naeslundii* (67,8%), *M. chelonae* (64,0%), *K. pneumoniae* (57,2%), *R. erythropolis* (62,4%), *N. meningitidis* C (51,7%), *B. longum* (60,0%), *B. mallei* Turkey2 хромосома 1 (68,2%), *M. leprae* (57,8%), *C. diphtheria* (53,6%), *E. coli* str. K-12 (50,6%), *L. monocytogenes* (37,9%), *L. pneumophila* (38,3%), *S. mutans* (36,8%), *S. aureus* (32,7%), *C. difficile* (28,5%). Выполнен анализ сходства и различия генов *PE_PGRS* у *M. tuberculosis* 31d, *M. tuberculosis* 4860, *M. bovis* (GenBank NCBI CP109681.1), *M. bovis* BCG (GenBank NCBI CP003494.1), *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank, NCBI: NC_000962.3) с помощью BLAST, NCBI. Конформационные структуры ДНК анализировали с помощью mfold (<http://www.unafold.org>).

Результаты. Значительная часть изменений у МБТ 4860 связана с перестройками генов из семейства *PE_PGRS*: из 59 генов 28 (47,5±6,6%) генов имели совпадение первичной структуры с МБТ H37Rv, остальные *PE_PGRS* гены содержали мутации.

Анализ генов семейства *PE_PGRS* у МБТ H37Rv свидетельствует о высоком содержании в них CGGC: доля CGGC в генах *PE_PGRS* варьируется от 2,11 до 8,42 %, в то время как в среднем в геноме МБТ составляет 1,62 %. Установлено, что в некоторых генах генома МБТ CGGC вообще не встречается: Rv0011 (кодирует белок клеточного деления CrgA, Rv0100 (гипотетический белок), Rv0460 (гипотетический белок), Rv0616A (антитоксин VarB29), Rv0691A (предшественник микофакторина), Rv0722 (50S рибосомный белок L30), Rv0863 (гипотетический белок), Rv0909 (антитоксин), Rv1038c (ESAT-6-подобный белок EsxJ), Rv1197 (ESAT-6-подобный белок EsxK), Rv2347c (ESAT-6-подобный белок EsxP), v2452c (гипотетический белок), Rv3053c (белок переноса электронов глутаредоксина NrdH), Rv3320c (рибонуклеаза VarC44).

Анализ конформации ДНК в местах локализации мутаций-резистентности к противотуберкулезным лекарственным средствам показал, что мутации происходят в местах формирования вторичных конформационных структур ДНК — шпилек, и наличие таких комбинаций нуклеотидов как gсgс, gссg, сgсс, gctg в геноме способствует их образованию. Высокое содержание «стерических» тетра-нуклеотидов GCCG в некоторых генах семейства *PE_PGRS* может иметь промутагенный эффект и обеспечивать изменчивость этих генов. Способность к изменчивости ДНК распределена неравномерно в геноме МБТ и определяется присутствием комбинаций нуклеотидов, приводящих к формированию вторичных ДНК-структур. События мутаций имеют ограниченную спонтанность. Первичная структура геном МБТ обладает функцией программирования мутаций. Близкие по систематическому положению (из одного рода и порядка) и характеризующиеся антигенной стабильностью *M. leprae* и *C. diphtheria* имели небольшое количество генов с удельным весом CGGC более 2,5% — 8 и 3 гена, соответственно, у *M. tuberculosis* — 226 гена. Значительный пул генов с содержанием CGGC более 2,5%

был характерен *N. asteroides* — 965 гена, *P. aeruginosa* — 639, *B. mallei* хромосома 2 — 765, *M. intracellulare* — 619, *M. kansasii* — 591 ген, *M. marinum* — 305, *M. tuberculosis* — 226. У еще одного представителя порядка *Actinomycetales* — *A. naeslundii* — в геноме находилось 70 генов с содержанием CGGC более 2,5%. У грамотрицательных микроорганизмов — *K. pneumoniae* и *N. meningitidis* C, характеризующихся антигенной вариабельностью, также присутствовал пул генов с CGGC>2,5% — 38 и 26 гена соответственно.

Делеция/инсерция одного или двух нуклеотидов в гене приводит к сдвигу рамки считывания, последствия чего могут быть устранены терминацией синтеза белка за счет формирования стоп-кодонов. Анализ присутствия в генах потенциальных стоп-кодонов, которые, смещаясь на 1 или 2 нуклеотида (вследствие делеции/инсерции одного или двух нуклеотидов), формируют стоп-кодон, показал, что наиболее распространенными тринуклеотидами в генах генома среди исследованных микроорганизмов являлись TGA, которые встречались преимущественно во всех генах. Количество генов с полным отсутствием TGA варьировалось у разных микроорганизмов, но, преимущественно, было небольшим: *N. asteroides* — 59 генов, *A. baumannii* — 4 гена, *C. difficile* — 60 генов, *C. diphtheria* — 37, *E. coli* — 4, *K. pneumoniae* — 23, *M. leprae* — 21, *M. kansasii* — 75, *M. chelonae* — 36, *S. mutans* — 45, *S. pneumoniae* — 4, *S. aureus* — 15 генов. Удельный вес потенциальных стоп-кодонов TGA в генах геномов зависит от вида микроорганизмов: у микроорганизмов с более высоким удельным весом CGGC в геноме был более низкий удельный вес TGA в генах генома. У *M. tuberculosis* среднее содержание потенциальных стоп-кодонов (TGA+TAA+TAG) составляло — 1,28%, у *N. asteroides* — 1,01%, *B. mallei* хромосома 2 — 1,13%, *M. chelonae* — 1,34%, *M. intracellulare* — 1,12%, *M. kansasii* — 1,21%, *P. aeruginosa* — 1,15%, *M. leprae* — 1,61 %, *C. diphtheria* — 1,73 %, *L. pneumophila* — 2,26%, *S. mutans* — 2,48 %, *S. pneumoniae* — 2,46 %, *S. aureus* — 2,5%, *E. coli* str. K-12 — 2,19%, *K. pneumoniae* — 1,93 %, *A. baumannii* — 2,35 %. Было установлено, что существует достоверная взаимосвязь между высоким содержанием CGGC (>= 5%) в генах *PE_PGRS* и низким содержанием потенциальных стоп-кодонов (<1,3) и наоборот ($p < 0,01$; $\chi^2 = 16,6$; пороговое значение $\chi^2 = 6,635$).

Сравнительный анализ первичной структуры генов *PE_PGRS* *M. tuberculosis* H37Rv versus *M. tuberculosis* 31d, *M. tuberculosis* 4860, *M. bovis*, *M. bovis* BCG свидетельствует о том, что идентичными у всех этих микроорганизмов были гены *PE_PGRS*11, *PE_PGRS*12, *PE_PGRS*16, *PE_PGRS*31, *PE_PGRS*39, *PE_PGRS*40, *PE_PGRS*62 и очень схожими — гены *PE_PGRS*35, *PE_PGRS*32, *PE_PGRS*46, *PE_PGRS* 58, *PE_PGRS*60 (отличались одной мутацией). Остальные гены *PE_PGRS* у *M. tuberculosis* 31d и *M. tuberculosis* 4860 отличались от *M. bovis*, *M. bovis* BCG. У *M. tuberculosis* 4860, относящихся к генотипу LAM, было большее сходство генов *PE_PGRS* с *M. bovis*, чем у *M. tuberculosis* 31d (генотип Beijing).

Выводы. У МБТ промутационные свойства поддерживаются за счет повышенного содержания CGGC-мотивов, приводящих к формированию конформационных структур и ошибкам репликации, и сниженного количества потенциальных стоп-кодонов TAG, которые ограничивают изменчивость. *PE_PGRS* гены *M. bovis* имеют структурные отличия от *PE_PGRS* *M. tuberculosis* генотипов LAM и Beijing.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ КУ-ЛИХОРАДКИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

Бондаренко Е.И.¹, Демина О.К.¹, Аглетдинов Э.Ф.¹, Калугина Ю.А.², Шварц. Я.Ш.², Ставицкая Н.В.², Грачева А.Н.³, Панова А.Е.³, Варнавская О.В.⁴, Офицеров В.И.¹

¹ АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

² ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Минздрава РФ, Новосибирск, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний», Москва, Россия

⁴ Белорецкий филиал ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер», Белорецк, Республика Башкортостан, Россия

В последние годы отмечено увеличение числа больных туберкулезом (ТБ) с сопутствующими вирусными и бактериальными заболеваниями, которые изменяют его типичное течение, затрудняют диагностику и лечение, создавая серьезные проблемы для фтизиатров. Предпосылками для образования ко-инфекций является негативное влияние активного ТБ на иммунную систему человека. В то же время развитию туберкулезной инфекции и её прогрессированию может способствовать иммунный дисбаланс, обусловленный течением другого заболевания. Среди впервые выявленных больных туберкулезом легких коморбидная патология встречается почти в 50 % случаев. Её своевременная диагностика и адекватное лечение сопутствующего заболевания, может значительно облегчить химиотерапию ТБ. В 2022 году нами были опубликованы результаты выявления ДНК *Coxiella burnetii* — возбудителя Ку-лихорадки в мокроте группы пациентов ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза», Россия (ННИИТ, Новосибирск) [1]. Ку-лихорадка (кокциеллез) — самое распространенное в мире природно-очаговое заболевание, случаи которого зарегистрированы в 50 административных образованиях Российской Федерации.

Цель — выявление сопутствующей Ку-лихорадки у больных ТБ из трех различных регионов России.

Материалы и методы. В работе исследовали 1187 образцов мокроты больных ТБ из трех учреждений: (ННИИТ, Новосибирск), ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» (НМИЦ ФПИ, Москва, Россия) и

Белорецкий филиал ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер» (РКПТБ, Белорецк, Республика Башкортостан) (таблица). Инактивацию образцов мокроты больных, выделение суммарных нуклеиновых кислот (НК) и выявление фрагмента гена трансспозазы *IS1111 C. burnetii* в пробах НК полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием экспериментального лабораторного теста проводили как описано нами ранее [1, 2]. Часть образцов НК с положительным результатом ПЦР-РВ секвенировали на приборе GeneticAnalyzer 3500 (Applied Biosystems, США). Для определения антител к антигенам *C. burnetii* в образцах сыворотки крови 74 пациентов использовали наборы реагентов: «*Coxiella burnetii* ELISA IgM» и «*Coxiella burnetii* ELISA IgG» (Vircell, Испания), а также «Тест-систему иммуноферментную для выявления антител класса IgG к антигенам кокциелл Бернета» (Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Россия).

Результаты. При анализе образцов суммарной НК, выделенной из мокроты 1187 больных ТБ из медицинских учреждений трех различных регионов России, генетический материал *C. burnetii* был выявлен у 64 (5,4 %) человек (таблица). Доля носителей ДНК Ку-лихорадки среди обследованных пациентов ННИИТ (Новосибирск) составила 10,0 %, РКПТБ (Белорецк) — 7,3 %, НМИЦ ФПИ (Москва) — 4,3 %. В пробах с положительным результатом ПЦР-РВ значение порогового цикла (Ct) варьировало от 39 до 32 цикла, что свидетельствовало о наличии в них от 2 до 256 копий гена *IS1111 C. burnetii*.

ТАБЛИЦА. РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *C. BURNETII* В ОБРАЗЦАХ МОКРОТЫ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ МЕТОДОМ ПЦР-РВ

Образцы пациентов с туберкулезом	Количество образцов	
	Исследованных в группе	Содержащих ДНК <i>C. burnetii</i> (%)
ННИИТ (г. Новосибирск)	170	17 (10,0)
НМИЦ ФПИ (г. Москва)	907	39 (4,3)
РКПТБ (г. Белорецк)	110	8 (7,3)
Итого	1187	64 (5,4)

Весьма низкая концентрация кокциелл в образцах мокроты, вероятно, обусловлена вялотекущим течением Ку-лихорадки, которая присоединилась к активному ТБ, вызвавшему иммунный дисбаланс. Вместе с тем можно пред-

положить, что триггером активации туберкулезной инфекции было заражение пациента возбудителем кокциеллеза.

Секвенирование по Сенгеру участка гена *IS1111*, проведенное для 16 из 64 (23,4 %) образцов с положительным

результатом ПЦР-РВ, подтвердило наличие в них ДНК *S. burnetii*. В результате молекулярно-генетического анализа было показано, что полученные нами нуклеотидные последовательности идентичны между собой и не имеют отличий от более 20 последовательностей фрагмента гена *IS1111* в различных штаммах и изолятах коксиелл из разных регионов Земли, представленных в базе данных GenBank. При исследовании образцов сыворотки крови 13 больных ТБ, в мокроте которых был обнаружен генетический материал возбудителя Ку-лихорадки, сероположительными в отношении *S. burnetii* оказались 6 (46,2 %) пациентов. При этом у одного из них выявлялись IgM к антигенам коксиелл, а у 5 человек — специфические IgG. Тестирование 51 больного ТБ, которые не были обследованы методом ПЦР-РВ, выявило серологические маркеры Ку-лихорадки у 24 (47,1 %) человек. У 4 из них одновременно были определены специфические IgM и IgG, что позволяет сделать вывод о недавнем инфицировании *S. burnetii*. Наличие IgG к антигенам коксиелл в сыворотке крови остальных 20 больных ТБ свидетельствует о том, что у них развился гуморальный иммунный ответ к этому патогенному микроорганизму.

Заключение. Выявление генетических и серологических маркеров Ку-лихорадки у больных туберкулезом

из трех разных регионов России даёт основание предполагать, что сочетанное течение этих инфекций может иметь весьма широкое распространение. Применение комплекса молекулярно-генетических и серологических методов анализа позволяет проводить диагностику и оценку стадии развития коксиеллёза, который сопутствует туберкулёзу.

Литература

1. Колпакова Т. А. Проблема коморбидности в клинике легочного туберкулеза. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2011. Т. 78. №2. С. 48–51.

2. Бондаренко Е.И., Кудряшов А.В., Евдокимова Л.С., Ткачев С.Е., Аглетдинов Э.Ф., Шварц Я.Ш., Ставицкая Н.В. Выявление генетических маркеров возбудителя лихорадки Ку в образцах мокроты от больных туберкулезом. Клиническая лабораторная диагностика. 2022. Т. 67. № 12. С. 729–738.

3. Бондаренко Е.И., Филимонова Е.С., Краснова Е.И., Криницина Э.В., Ткачев С.Е. Случаи заболевания Ку-лихорадкой, выявленные у жителей Новосибирской области, госпитализированных с подозрением на инфекции, передаваемые клещами. Клиническая лабораторная диагностика. 2021. Т. 65. № 11. С. 229–236.

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS И ПРИЕМА АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ НА ИСХОДЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-АССОЦИИРОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

Герасимова А.А.¹, Вязовая А.А.¹, Мокроусов И.В.¹, Пантелеев А.М.², Журавлев В.Ю.³, Соловьева Н.С.³

¹ Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

² СПб ГБУЗ «Противотуберкулезный диспансер №2»

³ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения Российской Федерации

Цель: сравнить течение и исходы заболевания у больных ВИЧ-ассоциированным туберкулезом в зависимости от генотипа *Mycobacterium tuberculosis* и приема антиретровирусной терапии.

Материалы и методы: были изучены 93 штамма *M. tuberculosis* от больных с генерализованным и ВИЧ-инфекцией, получавших АРВТ были изучены 63 штамма *M. tuberculosis* от больных, умерших от ВИЧ-ассоциированного туберкулеза. Генотипирование проводили методом ПЦР, анализируя специфические маркеры (*dnaA-dna::IS6110*, *Rv2664-Rv2665::IS6110*, *sigE98*, *RD181*, *NTF*), *MIRU-VNTR*, сплиготикирование; также были изучены истории болезни пациентов обеих групп.

Результат: В 1 группе все больные регулярно получали АРВТ; во второй 68% (n=43) не получали АРВТ, 12,6% (n=8) принимали АРВТ нерегулярно, у 17,4% (n=11) было отмечено прогрессирование заболевания на фоне постоянного приема АРВТ.

Вирусную нагрузку (ВН) удалось определить у 34 и 25 пациентов соответственно. В первой группе было 30 больных с низкой ВН (до 10000 копий/мл), 1 со средней (10000–100000) и 3 с высокой (более 100000 копий/мл). Во второй

группе было 11 больных с низкой ВН (P = 0.0020), 1 со средней (P = 0.8307) и 13 с высокой (P = 0.0104).

Количество CD4 клеток было определено у 54 и 35 больных соответственно; в группе 1 было 10 пациентов с незначительным иммунодефицитом (CD4 более 500 мкл), 12 с умеренным (CD4 350 — 499 мкл), 18 с выраженным (CD4 200 — 349 мкл) и 14 больных с тяжелым иммунодефицитом (CD4 <200 мкл или <15%). В группе 2 было 3 пациента с незначительным иммунодефицитом (разница с группой 1 статистически незначима — P > 0.05), 3 с выраженным (P = 0.0397), 29 с тяжелым (P = 0.0030). Людей с умеренным иммунодефицитом в группе 2 не было, но разница оказалась статистически незначима (P > 0.05). Среди штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных обеих групп, было замечено преобладание генотипа Beijing: 68,2% (43 из 63) и 87% (81 из 93). Также встречались генотипы LAM (3,1% и 1%), T (4,7% и 1%), Orphan (3,1% и 2%) и другие генотипы (по 1%). В группе 2 были выявлены генотипы Ural (7,9%) и X1 (1,5%), но разница в структуре групп была статистически незначима (P > 0.05).

Среди причин смерти пациентов 2 группы преобладало прогрессирование туберкулеза — оно привело к

смерти 42,8% больных (n=27); на втором месте был отек головного мозга — 25% (n=16); 17% больных умерли от интоксикации, 10% — от сердечно-легочной недостаточности, и у 5% была выявлена полиорганная недостаточность. Корреляции между причиной смерти и генотипом *M. tuberculosis* выявлено не было ($P > 0.05$).

В группе 1 смертельных исходов не было; все больные этой группы, пройдя плановое лечение, были выписаны с улучшением состояния.

Вывод: В большинстве случаев своевременное назначение и регулярный прием АРВТ значительно облегчает состояние больных, улучшает прогноз для лечения

ВИЧ-ассоциированных заболеваний (в данном случае туберкулеза) и препятствует развитию таких опасных для жизни состояний, как отек головного мозга, сердечно-легочная недостаточность и полиорганная недостаточность.

В обеих группах преобладали штаммы генотипа Beijing, присутствовали также штаммы генотипов LAM, T и Orphan; статистически значимой разницы в структуре двух групп выявлено не было ($P > 0.05$), хотя в группе 1 присутствовали генотипы Ural и X1, не представленные в группе 2. Не было выявлено какой-либо корреляции между причиной смерти и генотипом *M. tuberculosis* ($P > 0.05$).

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ДНК-НАНОСЕНСОРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В GC БОГАТЫХ УЧАСТКАХ ГЕНОМА НА ПРИМЕРЕ *Mycobacterium tuberculosis*

Луганская П. С.¹, Рубель М.С.¹, Покатова О.Ю.¹, Старкова П.А.¹, Колпащиков Д.М.²

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² Университет Центральной Флориды, Орlando, Флорида, США

Введение. Возможность диагностики однонуклеотидных вариаций (ОНВ) в гуанин-цитозин— (GC) богатых участках ДНК с помощью гибридационных зондов до сих пор остается крайне дискуссионной [1]. GC-богатые участки двуцепочечной (дц) ДНК труднорасплетаемы, поскольку имеют высокую температуру плавления, а гибридационные зонды, комплементарные таким участкам, часто образуют стабильные вторичные структуры. Многие важные для клинической диагностики участки ДНК имеют высокий процент GC-оснований в своём составе. Например, с этим связана сложность диагностики вирусных заболеваний или определения устойчивости к антибиотикам *Mycobacterium tuberculosis* — эти системы крайне GC-богаты.

Использование многокомпонентных гибридационных проб, в том числе бинарных ДНК-зондов и ДНК-наномашин, для решения подобных задач представляется перспективным. Основным преимуществом таким проб является возможность разделения эффективной длины пробы на расплетающую часть — длинную имеющую высокое сродство к анализу, и ОНВ-чувствительную часть — короткую для того, чтобы формирование сигнала нарушалось в случае наличия ОНВ [2].

Цель. Данное сообщение описывает применение многокомпонентных гибридационных зондов для определения ОНВ в GC-богатых участках на примере *M. tuberculosis*. В ходе работы использовались зонды на основе РНК-расщепляющего дезоксирибозима, состоящие из 2-х ДНК олигонуклеотидных цепей и флуорогенного субстрата. В присутствии аналита в реакционной среде, ДНК цепи наносенсора комплементарно связываются с ним, собирая воедино дезоксирибозимное ядро, которое способно многократно расщеплять флуорогенный

субстрат, тем самым повышая флуоресценцию образца. В данной работе для детекции GC-богатых участков ДНК анализаторов, наносенсоры снабжались дополнительными связывающими руками в составе более сложных конструкций, названных ДНК наномашинками. Кроме того, примеры, используемые для амплификации, оснащались дополнительными 5' — концевыми фрагментами для упрочнения сродства ДНК машины к дцДНК ампликону.

Материалы и методы. Данный проект применен на исследовании возможности создания диагностического набора праймеров и ДНК-наномашин для определения ОНВ системы токсин-антитоксин *M. tuberculosis*. Учёные из Института Общей Генетики им. Вавилова разработали схему, основанную на 9 генах системы токсин-антитоксин *M. tuberculosis*, которая позволяет отследить район происхождения конкретного штамма по комбинации однонуклеотидных полиморфизмов в этих генах. В качестве модели нами были выбраны гены *VarC37* (48:G), *VarC38* (143:C) и *HigA1* (363:T) ассоциированные с подтипом Beijing-modern, являющимся одним из наиболее значимых подтипов генотипа Beijing, который соответствует Восточно-Европейской линии *M. tuberculosis* [3]. Все эти гены имеют относительно высокий GC-состав в пределах 60%, но различный профиль распределения. Были созданы ДНК-наномашинки различной конфигурации и определены основные закономерности эффективности.

Основные результаты. В представленном исследовании мы определяем основные закономерности дизайна и влияния GC-профиля последовательности и выбора локализации исследуемого фрагмента относительно амплифицируемого фрагмента. Также в работе предлагается новый концепт ДНК-наномашинки, структура которой по-

тенсиально способствует лучшему включению сенсора в двухцепочечный ампликон. Ее особенность заключается в введении в последовательность одноцепочечной toehold опоры в ходе амплификации. Такая опора увеличивает вероятность ассоциации ДНК-наномашин вблизи двухцепочечного участка, а значит и возможность интеграции в него. Были разработаны дизайны олигонуклеотидных последовательностей для ДНК-наносенсоров генов *VarC37*, *VarC38* и *HigA1*. Также были разработаны системы праймеров для каждого гена и проведены проверки на возможность использования полученных систем для амплификации необходимых участков генов. ДНК-наномашин успешно определили наличие ОНВ в амплифицируемых фрагментах.

Заключение. Разработанная ДНК наномашин может упростить проведение тестов в лаборатории, в связи с высокой селективностью и способностью узнавать дцДНК ампликоны без стадии отжига с зондами. Так же к достоин-

ствам можно отнести высокую стабильность сенсоров за счёт биохимической и термальной стабильностью ДНК-наномашин по сравнению с белками.

Авторы исследования благодарны Российскому научному фонду (грант 22-24-00664) и программе «Приоритет 2030» за финансовую поддержку.

Литература

1. Assal N, Lin M. PCR procedures to amplify GC-rich DNA sequences of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Microbiological Methods*. 2021;181:106121.

2. Kolpashchikov D. M. Evolution of hybridization probes to DNA machines and robots. *Accounts of Chemical Research*. 2019;52(7):1949-1956.

3. Zaychikova, M. V., Zakharevich, N. V., Sagaidak, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic Polymorphisms and Functional Properties and the Possibility of Their Use for Genotyping. *PLOS ONE*. 2015;10(12): e0143682.

ДИНАМИКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ГЕНЕТИЧЕСКОГО СЕМЕЙСТВА BEIJING В БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Тюрина Е.Б.^{1,2}, Павленко Е.В.¹, Круть И.В.²

¹ НИУ «БелГУ», Белгород, Россия

² ОГКУЗ «Противотуберкулезный диспансер», Белгород, Россия

Введение. В Белгородской области в течение последних лет остается высокой доля больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis*. Во многом это связано с распространением генетического семейства Beijing, которое обладает выраженной ассоциированностью с множественной лекарственной устойчивостью. Возникает необходимость динамического слежения за распространением на территории области генетического семейства возбудителя Beijing.

Цель и задачи. Оценить распространенность штаммов *M.tuberculosis* генетического семейства Beijing в Белгородской области, провести сравнительный анализ динамики его распространения на временном интервале с 2015 по 2022 г.г.

Материалы и методы. С помощью наборов «СПО-ЛИГО-БИОЧИП» и «ТБ-ТЕСТ» (производство ООО «Биочип-ИМБ», г.Москва) проведено исследование 311 штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких в Белгородской области в 2015-2017 г.г., а также 182 штаммов, выделенных в 2020 — 2022 г.г. Все штаммы были получены на этапе диагностики и подбирались по принципу «один больной — один штамм».

Результаты. Штаммы генетического семейства Beijing наиболее широко представлены среди всех исследованных штаммов; кроме того, обнаружено нарастание доли этого семейства на 20,1% в 2020 — 2022 г.г. по сравнению с 2015-2017 г.г. — 61,0% против 50,8% (таблица).

ТАБЛИЦА. ДО ЛИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО СЕМЕЙСТВА BEIJING СРЕДИ ШТАММОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ РАЗНЫХ КАТЕГОРИЙ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Показатели	2015–2017 г.г.	2020–2022 г.г.	Рост/снижение (%)
Доля Beijing среди всех исследованных штаммов (%)	50,8	61,0	+20,1
Доля Beijing среди штаммов, выделенных от впервые выявленных больных (%)	45,0	59,7	+32,7
Доля Beijing среди штаммов, выделенных от ранее леченных больных (%)	70,4	79,2	+12,5
Доля Beijing среди штаммов с МЛУ (%)	82,4	78,7	-4,5
Доля Beijing среди штаммов с не-МЛУ (%)	31,3	41,7	+33,2

Выявлены значимые различия между долями семейства Beijing у разных категорий пациентов за исследуемые периоды времени. Так, среди штаммов, выделенных от впервые выявленных больных, в 2020 — 2022 г.г. отмечен рост доли Beijing на 32,7% — 59,7% против 45,0%.

Увеличилась доля Beijing и среди штаммов, выделенных от ранее леченных больных на 12,5% — 79,2% против 70,4%.

Среди штаммов с не-МЛУ доля Beijing выросла на 33,2% — 41,7% против 31,3%.

Среди штаммов с МЛУ зарегистрировано небольшое снижение доли Beijing на 4,5% — 78,7% против 82,8%.

Выводы. На территории Белгородской области продолжается распространение штаммов *M.tuberculosis* генетического семейства Beijing, связанного с множественной лекарственной устойчивостью. Данное семейство вносит значительный вклад в эпидемический процесс. В этих условиях возрастает роль лабораторных исследований по генетическому типированию штаммов *M.tuberculosis*, анализа их результатов и динамическому наблюдению за распространением Beijing. Это позволит обеспечить дифференцированный подход к работе в очагах туберкулеза, особенно с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя.

ДИСБИОЗ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ КАК ПРЕДИКТОР НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ИСХОДА ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Юнусбаева М.М.¹, Бородина Л. Я.², Закирова А. М.², Терентьева Д. Р.¹, Юнусбаев Б. Б.¹

¹ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО» (ИТМО), г. Санкт-Петербург, Россия

² ГБУЗ Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер (РКПТД), г. Уфа, Россия

В настоящее время общепризнано, что сбалансированный кишечный микробиоценоз важен для нормальной жизнедеятельности организма, а изменение состава населяющих кишечник микроорганизмов является причиной многих заболеваний. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что дисбактериоз микробиоты кишечника может модулировать восприимчивость организма к *Mycobacterium tuberculosis*, способствовать переходу латентного туберкулеза в активный туберкулез (ТБ), а также оказывать влияние на противотуберкулезную терапию (Comberiati P. et al., 2021; Wood M.R et al., 2017).

Цель настоящего исследования — изучение видового состава и разнообразия микробиома толстого кишечника больных туберкулезом легких и здорового контроля, а также поиск предикторов неблагоприятного исхода лечения.

Материалы и методы: В работе использовали образцы метагеномной ДНК, выделенной из фекалий 23 больных ТБ и 47 здоровых доноров. Больные ТБ отбирались на базе ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер» г. Уфа в период с 2019 по 2021 гг. В исследование были включены только пациенты с впервые выявленным туберкулезом легких. Забор биоматериала проведен строго при поступлении в стационар, до начала приема противотуберкулезных препаратов. Все пациенты и здоровые добровольцы предоставили информированное согласие на участие в исследовании.

Полногеномное секвенирование метагенома проводилось на платформе Illumina HiSeq2500. Анализ метагеномных данных проводился с использованием пакетов программ microbiome программной среды R. Визуализацию результатов анализа методом главных компонент (РСоА) проводили на основе матриц дистанций с применением пакета программ vegan. Для установления таксонов, характеризующих дифференциацию между двумя группами, был использован линейный дискриминантный анализ (LEfSe). Для каждого таксона, вносящего вклад в диффе-

ренциацию, мы также оценили индивидуальный вклад в виде LDA коэффициента.

Основные результаты: Значения альфа-разнообразия, которые описывают богатство микробного сообщества, были сопоставимы в обеих анализируемых группах ($p=0,76$). В общей сложности во всех образцах, полученных от больных ТБ, было идентифицировано 719 видов бактерий, в группе контроля — 983 вида. Сравнение бета-разнообразия (расстояние Брея-Кертиса) выявило статистически значимую дифференциацию видового состава микробиома кишечника больных ТБ от здоровых доноров ($p=0,007$). Оценка различий выборок в таксономическом составе методом РСоА показала, что общая структура микробиома кишечника больных активным ТБ сильно различается от здорового контроля. Кишечная микробиота больных ТБ характеризовалась снижением доли *Bacteroidetes* за счет увеличения численности представителей типов *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Так, в группе больных ТБ до начала лечения доля представителей типа *Firmicutes* составляла 36,25%, тогда как в группе контроля 71,2% ($p < 0,05$). Количество представителей типа *Proteobacteria* также превалировала у больных ТБ (7,5%) по сравнению с контролем (3%, $p < 0,05$). Линейный дискриминантный анализ LEfSe позволил выявить 188 дифференциально представленных таксонов в группе больных ТБ до начала лечения ($p \leq 0,05$; $LDA \geq 2$). Так, виды *Phocaeicola dorei*, *Escherichia coli*, *Prevotella copri clade C* и *Akkermansia muciniphila* были сильно обогащены в группе больных ТБ, тогда как *Phocaeicola vulgatus*, *Alistipes putredinis*, *Prevotella copri clade B*, *Prevotella SGB1589* были более многочисленны в группе контроля. Сравнение отдаленных результатов лечения (через год) и бактериального состава микробиома кишечника больных ТБ показало, что неэффективный курс химиотерапии характеризуется сильнейшим дисбиозом кишечника с превалированием представителей Enterobacteriaceae, тогда как структура кишечного микробиома пациентов с эффективным курсом

лечения близка по своей структуре к таковому здорового индивида.

Заключение: Микробиом кишечника больных активным ТБ характеризуется измененной структурой кишечного сообщества с преобладанием бактерий, способствующих и поддерживающих воспалительный фон в кишечнике. Дисбиотические изменения в структуре микробного сообщества приводят к источению облигатно-анаэробных бактерий и обогащению факультативно-анаэробных бактерий и оппортунистических патогенов. Можно заключить, что воспалительный фон в организме, возникающий в результате инфицирования легких *M. tuberculosis*, может из

бирательно усиливать рост патобионтов и способствовать формированию альтернативного кишечного микробиома.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 22-25-00272).

Comberiat P, Di Cicco M., Paravati F., Pelosi U., Di Gangi A., Arasi S., Barni S., Caimmi D., Mastroilli C., Licari A., Chiera F. The role of gut and lung microbiota in susceptibility to tuberculosis. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health*, 2021, vol. 18, no. 22, pp. 12220.

Wood M.R., Yu E.A., Mehta S. The human microbiome in the fight against tuberculosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2017, vol. 96, no. 6, pp. 1274-1284.

МАРКЕРЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ В ПРОГНОЗЕ ВЕНТИЛЯЦИОННЫХ | НАРУШЕНИЙ РЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Эсмедляева Д.С.¹, Алексеева Н.П.², Кирюхина Л.Д.¹, Дьякова М.Е.¹.

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2-4, Лиговский пр., Санкт-Петербург, 191036

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», 7/9, Университетская наб., Санкт-Петербург, 199034

Деградация внеклеточного матрикса соединительной ткани, обусловленная смещением баланса в системе матриксные металлопротеиназы (ММП)/ ингибиторы в сторону протеиназ приводит к патологическому ремоделированию, формируя морфологическую основу для функциональных нарушений внешнего дыхания (ФВД).

Цель. Изучить взаимосвязь показателей системы ММП/ингибиторы в крови с показателями вентиляционно-газообменных нарушений у пациентов с хроническими формами туберкулеза легких (ТЛ) и оценить их прогностическую значимость.

Материалы и методы. Обследованы больные с хроническими формами ТЛ, такими как туберкулема (n=45) и фиброзно-кавернозный ТЛ (n=85), находящиеся на лечении в НИИФ. Всем пациентам проведена компьютерная томография органов грудной полости. Оценка ФВД проводили методом спирометрии, бодиплетизмографии с исследованием диффузионной способности

легких по угарному газу (ДСЛ) с помощью функционального диагностического комплекса экспертного класса MasterScreen (Viasys Healthcare, Германия) в соответствии со стандартами Американского торакального и Европейского респираторного обществ (ATS/ERS). В сыворотке крови определяли концентрации ММП-1,-3,-8,-9 и их ингибиторов ТИМП-1 и $\alpha 2$ -макроглобулина (МГ) методом ELISA («R&D Systems», Minneapolis, MN, USA). Применяли Statistica 7.0. Для изучения структуры взаимосвязи ММП с показателями ФВД использовалась модель ковариационного анализа, в которой в качестве зависимых переменных рассматривались показатели ММП, в качестве факторов — клиническая форма (КФ) и статус табакокурения (ТК), а в качестве ковариат — характеристики ФВД (n=14).

Результаты. При ограниченном процессе (туберкулема) более половины больных не имели вентиляционных нарушений. При наличии нарушений (40%) они носили обструктивный характер в 90% случаев, а в 10% случаев выявлялся изолированный рестриктивный вариант нарушений. Обструктивные нарушения у больных ФКТ выявлялись в 71%, смешанный вариант — в 18,6%, а изолированный рестриктивный — в 7,1% случаев. В большинстве случаев нарушения легочного газообмена имели выраженный характер.

В группе с туберкулемой выявлен повышенный уровень ММП-1,-8,-9 и контрольные значения ММП-3. Величина ТИМП-1 не отличалась от группы контроля, тогда как активность МГ была низкой. Для ФКТ выявлен повышенный уровень всех протеиназ и одного из ингибиторов — ТИМП-1 при низкой активности МГ.

При рассмотрении ТИМП-1 в качестве зависимой переменной было выявлено, что его изменения связаны с объемом форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ1), жизненной емкостью легких (ЖЕЛ), емкостью вдоха (Евд) и резервным объемом выдоха (РОВд). Коэффициент детерминации (R²) составил 0,80 при уровне значимости модели в целом равном 9,546e-05. Изменения ММП-8 были связаны только с ДСЛ и подвержены влиянию КФ ($\beta=2,80$, $p=0,04$) и ТК ($R^2=2,14$, $p=0,01$). Согласно результатам ковариационного анализа, изменения ММП-9 были связаны с ОФВ1, ЖЕЛ, Евд., РО выд. с R² равном 0,76 ($p=0,006$). Значимого влияния показателей ФВД и факторов КФ, ТК на ММП-1 ($R^2 = 0,64$; $p=0,58$), ММП-3 ($R^2 = 0,34$; $p=0,81$) и $\alpha 2$ -МГ ($R^2 = 0,39$; $p=0,79$) обнаружено не было

Выводы. Предикторами вентиляционно-газообменных нарушений у больных ТЛ могут быть изменения ММП-8,-9 и ТИМП-1.

ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *VDR* ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ И ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Лавряшина М.Б.¹, Тхоренко Б.А.¹, Мейер А.В.¹, Холодов А.А.^{1,2}, Пьянзова Т.В.¹

¹ ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава РФ (КемГМУ), Кемерово, Россия

² ГБУЗ Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр им. И.Ф. Копыловой (КК ФПМЦ), Кемерово, Россия

Введение. Туберкулез — заболевание с хорошо известной этиологией, но до сих пор недостаточно изученной молекулярной биологией патогенеза. Несмотря на высокую интенсивность исследований [1-3] данные о молекулярно-биологических предикторах прогрессирования туберкулеза и ответа на терапию зачастую неоднозначны и не воспроизводятся в работах аналогичной направленности. Так как в случае *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) речь идет о коэволюции, то существенный вклад в эту неоднозначность должен вносить генетический полиморфизм, как самого возбудителя заболевания, так и инфицированного человека. Поэтому исследования, направленные на изучение полиморфных вариантов генов, задействованных в ответе организма человека на инфицирование, а также генетики самой бактерии *M. tuberculosis*, в том числе в региональном контексте, чрезвычайно актуальны.

Существенный интерес в этом ключе представляет система витамина D и его основной рецептор *VDR* (vitamin D receptor) — транскрипционный фактор, контролирующей экспрессию нескольких тысяч генов, в том числе, обеспечивающих иммунный ответ на *M. tuberculosis*. Активация внутриклеточного *VDR*-сигналинга играет важную роль в балансе про— и противовоспалительных реакций, контролируемых комплексами различных сигнальных путей (NFKB, MAPK, NFAT5, AMPK, GR и других).

Цель. Изучить частоты шести полиморфных вариантов (rs2228570-FokI, rs1544410-BsmI, rs7968585-ApaI, rs731236-TaqI, rs3847987, rs7975232) гена *VDR* в выборках населения крупного промышленного сибирского региона (Кемеровская область-Кузбасс) при туберкулезе (ТБ) и латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ).

Материалы и методы. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией под контролем локального этического комитета ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава РФ. Диагностика ЛТИ и ТБ осуществлена специалистами ГБУЗ Кузбасского клинического фтизиопульмонологического медицинского центра им. И.Ф. Копыловой (КК ФПМЦ), Кемерово. Суммарный объем выборки составил 175 человек, в том числе, «Популяционный контроль» — 60, «ЛТИ» — 49, «ТБ» — 66.

При формировании группы «Популяционный контроль», а также групп пациентов «ЛТИ» и «ТБ» учитывалась национальная принадлежность. В состав групп включались лица восточнославянской принадлежности, преимущественно русские.

ДНК из образцов крови выделяли методом фенол-хлороформной экстракции, генотипирование полиморфных вариантов гена *VDR* проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием наборов, синтезированных «ДНК-синтез» (г. Москва). По результатам генотипирования рассчитывали генотипические, аллель-

ные частоты и отношение шансов (OR). Для анализа распределения аллелей и генотипов использовали критерий χ^2 . Соответствие наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому оценивали при помощи критерия χ^2_{H-W} . Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты. Исследование выявило особенности характера распределения генотипических и аллельных частот исследованного спектра полиморфных вариантов гена *VDR* при туберкулезе и латентной туберкулезной инфекции. Так, в отношении rs2228570-FokI — единственной известной в данном гене высокополиморфной миссенс-мутации — анализ генотипических частот выявил более высокую частоту гетерозиготного генотипа AG среди инфицированных с ЛТИ (57%) и ТБ (51%) по сравнению с группой популяционного контроля (47%). Гомозиготный генотип AA rs2228570-FokI чаще регистрировался у пациентов с ТБ (27%), а GG — в популяционном контроле (34%). Частота носителей генотипа GG убывала в ряду «Популяционный контроль», «ЛТИ», «ТБ» (34%, 29% и 22% соответственно), что вполне логично вписывается в молекулярный контекст о более эффективном функционировании укороченной формы *VDR*, обуславливающей различные геномные эффекты, в том числе, активацию противовоспалительных механизмов, что идет в разрез со стратегией прогрессирования туберкулезной инфекции.

Частота гетерозиготного генотипа CA rs7975232 оказалась наиболее высока в группах «ЛТИ» (56%) и «ТБ» (60%) по сравнению популяционным контролем (48%). Гомозигота CC rs7975232 чаще выявлялась в группе «Популяционный контроль» (37%), а AA — среди пациентов с латентной туберкулезной инфекцией (29%). Литературные данные о влиянии rs7975232 на функциональную активность продукта гена *VDR* отсутствуют. Отметим, что данная rsSNP согласно данным NCBI находится на границе интрона 9 и экзона 10 (расположена в интроне 9 на 3'-конце на расстоянии 49 пн от экзона 10). Поэтому не исключено, что данное мутационное событие может модифицировать работу сплайсосомы, затрагивая сайты сплайсинга, и влиять на процессинг мРНК.

Частоты аллеля G rs2228570-FokI (0,58; 0,57; 0,47) и аллеля C rs7975232 (0,62; 0,45; 0,42) продемонстрировали тенденцию к снижению в ряду «Популяционный контроль», «ЛТИ», «ТБ».

При расчете показателя OR значимые результаты в отношении шансов развития ЛТИ и ТБ получены для rs2228570-FokI (OR(AA)=1,7 и 1,6; OR (AG)=1,5 и 1,2; OR (GG)=0,8 и 0,6, соответственно) и rs7975232 (OR(CC)=0,2 и 0,3; OR (CA)=1,5 и 1,4; OR (AA)=2,5 и 2,1, соответственно)

Выводы. По результатам исследования выявлены особенности характера распределения полиморфных вариантов rs2228570-FokI и rs7975232 при туберкулезе. Пока-

зана ассоциация генотипов AA и AG rs2228570-FokI, а также AA и CA rs7975232 с повышенным шансом развития туберкулеза легких и латентной туберкулезной инфекцией. Выявлена протективная роль генотипов GG rs2228570-FokI и CC rs7975232, что, по-видимому, обусловлено молекулярными механизмами, обеспечивающими эффективное функционирование рецептора витамина D.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материал подготовлен за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-25-20209, <https://rscf.ru/project/22-25-20209> и Министерства науки и высшего образования Кузбасса.

Список литературы.

1. Abel L., Fellay J., Haas D.W., Schurr E., Srikrishna G., Urbanowski M., Chaturvedi N., Srinivasan S., Johnson

D.H., Bishai W.R. Genetics of human susceptibility to active and latent tuberculosis: present knowledge and future perspectives. //Lancet Infect Dis. 2018 Mar;18(3):e64-e75. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30623-0.

2. Kim S.S., Lee S.I., Jin H.S., Park S. Tuberculosis risk is associated with genetic polymorphisms in the LRP2, CUBN, and VDR genes. //Genes Genomics. 2020 Oct;42(10):1189-1196. doi: 10.1007/s13258-020-00971-3.

3. Yu J., Liu M., Mijiti X., Liu H., Wang Q., Yin C., Anwaijiang A., Xu M., Li M., Deng L., Xiao H., Zhao X., Wan K., Li G., Yuan X. Association of Single-Nucleotide Polymorphisms in the VDR Gene with Tuberculosis and Infection of Beijing Genotype Mycobacterium tuberculosis. //Infect Drug Resist. 2023 May 22;16:3157-3169. doi: 10.2147/IDR.S407595.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Морозов К.В.¹, Шматов Ф.М.², Шипулин Г.А.¹, Черняева Е.Н.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Туберкулез (ТБ) — инфекционное заболевание, распространенное во всех странах мира, которое является важной проблемой современной системы здравоохранения, оказывающей значимое социальное и экономическое влияние. ТБ — одна из десяти основных причин смерти и основной причиной смерти, обусловленной каким-либо одним возбудителем инфекции (опережая ВИЧ/СПИД). Возбудителем туберкулеза является *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), которая входит в состав комплекса *Mycobacterium tuberculosis complex* и чаще всего поражает легкие. Серьезной проблемой является широкое распространение МБТ с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, что значительно снижает успешность терапии. Инфекция МБТ может иметь различные клинические проявления от латентного бессимптомного носительства до активного легочного или внелегочного проявления заболевания с различным рядом симптомов. ТБ, как и многие другие инфекции, относится к многофакторным заболеваниям. В его распространении и развитии большую роль играют социальные факторы, генетические особенности возбудителя, влияющие на патогенность, чувствительность к противотуберкулезным препаратам, а также особенности иммунной системы хозяина, которые могут быть обусловлены генетическими и эпигенетическими факторами.

Целью данной работы являлся поиск и анализ молекулярных биомаркеров наличия ТБ, а также оценки степени прогрессии заболевания и его типа (латентный или активный ТБ). Решение данной задачи позволит разработать надежную и эффективную систему для мониторинга ТБ статуса населения страны и быстро реагировать в слу-

чае необходимости. Для достижения поставленной цели, необходимо было предварительно решить ряд задач, а именно: анализ соответствующей литературы по тематике работы, выбор метода анализа и дизайна исследования, сбор данных из открытых источников для сравнительного анализа, а также последующий анализ данных и создание аналитической системы.

В качестве объекта исследования были выбраны образцы РНК-секвенирования клеток периферической крови человека (с предварительной деплецией генов глобина). При сборе образцов, была использована открытая база данных образцов секвенирования РНК GEO [1]. Среди всех датасетов были отобраны 5, представляющих когорту взрослых (от 20 до 75 лет) мужчин и женщин европеоидной расы, разделенных на 2 группы — здоровые доноры и больные туберкулезом, которые в части датасетов также делились на две подгруппы — те, у кого была диагностирована латентная и активная форма ТБ. Количество доноров в одном датасете варьировалось от 43 до 434 человек. Суммарно было отобрано 937 образцов доноров, из которых 624 были здоровы (не было выявлено признаков инфекционных заболеваний), а у 313 была диагностирована ТБ инфекция.

В результате проведенного исследования, был обнаружен 91 ген, связанный с различными процессами, происходящими в клетке (в частности миграция иммунных клеток из кровотока, а также маркеры активации Т клеток), вошедший в топ 100 изменивших экспрессию генов одновременно в как минимум 2 независимых датасетах (43 гена повысивших свою экспрессию в образцах больных

ТБ и 48 понизивших). Из них 9 генов попали в топ 100 изменивших экспрессию генов одновременно в как минимум 3 и более независимых датасетах, что показывает их потенциальную важность при туберкулезной инфекции, что делает их сильными претендентами в качестве молекулярных биомаркеров для диагностики туберкулеза. В частности, были обнаружены изменения в экспрессии цитокинов и связанных с ними белков, активирующих и мобилизирующих иммунную систему (IL2, IL27, IFI27, IFI6, IFI44 и др); белков связанных с активацией В— и Т-лимфоцитов и рецепторов киллерных клеток (NK-клеток) (CD274, CD69, KLRC2); а также поверхностных белков, связанных с анти-

генпрезентирующими клетками и процессом распознавания инородных патогенов, в частности ТБ (HLA-A, HLA-B, HLA-DQA, HLA-DOA).

В результате работы можно заключить, что имеется большое число генов, связанных с наличием и развитием туберкулезной инфекции, изменения которых воспроизводятся между независимыми датасетами, и которые можно использовать в качестве эффективных биомаркеров для диагностики туберкулеза.

Список литературы:

1. База данных образцов секвенирования РНК GEO. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ УСОВЕРШЕНСТВОВАННОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ *Mycobacterium tuberculosis complex* К РИФАМПИЦИНУ И ИЗОНИАЗИДУ, МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Микулович Ю.Л., Зайцева А.И., Шипулин Г.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России), Москва, Россия

Введение. Молекулярно-генетические методы (МГМ) анализа играют важную роль в комплексной диагностике туберкулеза (ТБ), в том числе его лекарственно устойчивых форм, поскольку позволяют быстро и эффективно получать результаты в тот же день, когда был сдан биологический материал в лабораторию, что очень важно для назначения больному своевременной корректной схемы противотуберкулезной терапии. Использование МГМ рекомендовано ВОЗ [1] и федеральными клиническими рекомендациями «Туберкулез у взрослых» [2]. Ранее в ФГБУ «ЦСП» ФМБА России был разработан и зарегистрирован как медицинское изделие для диагностики *in vitro* (МИ IVD) набор реагентов (НР) «АмплиТест® МБТ-Резист-1» (РУ № РЗН 2022/16720), который позволяет выявлять широкий спектр мутаций в области RRDR и кодоне 572 гена *rpoB*, кодоне 315 гена *katG* и участке промоторной области гена *inhA* (регуляторной области *fabG1-inhA*), связанных с устойчивостью *M. tuberculosis complex* (МБТ) к рифампицину (RIF) и изониазиду (INH). Его усовершенствованной версией стал НР «АмплиТест® МБТ-Резист-1 Люо», основными преимуществами которого по сравнению с прежним НР являются: 1) аналитическая чувствительность 500 ГЭ/мл, 2) удобство использования благодаря наличию трех готовых лиофилизованных реакционных смесей в стрипованных пробирках, что позволяет сократить временные и трудовые затраты при подготовке образцов к анализу, снизить риск ошибок пользователя, сэкономить расходные материалы, 3) возможность анализировать пробы ДНК из мочи, 4) адаптация к амплификатору QuantStudio 5.

Цель и задачи. Цель работы — оценка эффективности НР «АмплиТест® МБТ-Резист-1 Люо» на основе ПЦР-РВ при выявлении генетических маркеров резистентности

МБТ к RIF и INH в образцах биологического материала в сравнении с аналогичным по назначению зарегистрированным российским НР в клинических испытаниях для регистрации нового набора реагентов в качестве МИ IVD. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) исследовать одни и те же образцы с помощью испытуемого набора «АмплиТест® МБТ-Резист-1 Люо» и набора сравнения, 2) сравнить результаты, 3) вычислить показатели эффективности испытуемого НР относительно набора сравнения.

Материалы и методы. Клинические испытания проведены в государственном бюджетном учреждении здравоохранения Московской области «Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер» (ГБУЗ МО «МОКПТД»). Был исследован 251 образец ДНК, полученный из биологического материала человека (мокроты (N=73), бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) (N=51), биоптата (операционного материала; N=77), мочи (N=50)) от пациентов с ТБ легких и внелегочной локализации, содержащих ДНК МБТ в концентрации не менее 1000 ГЭ/мл, и 101 образец ДНК культур МБТ. В качестве наборов сравнения использовали НР «АмплиТест® МБТ-Резист-1 Люо» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2022/16720) для всех биологических образцов, кроме мочи, и «Амплитуб-МЛУ-РВ» (ООО «Синтол», Россия, РУ № ФСР 2010/07636) для мочи. Выделение тотальной ДНК и отбор проб ДНК МБТ в требуемой концентрации осуществляли с помощью НР «АмплиТест® МБТ» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2023/20838) и «Амплитуб-РВ» (ООО «Синтол», Россия, РУ № ФСР 2010/07635). Амплификацию проводили с использованием приборов: CFX96 (Bio-Rad, США), ДТпрайм (ДНК-Технология, РФ), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) — как вруч-

ную, так и с помощью специального ПО для автоматической интерпретации результатов.

Оценивали следующие показатели эффективности (с доверительной вероятностью 95%): положительное соответствие результатов (ПСП) — доля образцов, содержащих ДНК МБТ, в которых с помощью испытуемого НР обнаружены мутации, связанные с устойчивостью МБТ к RIF или INH, среди образцов с соответствующими мутациями, выявленными с помощью набора сравнения; отрицательное соответствие результатов (ОСП) — доля образцов, содержащих ДНК МБТ, в которых с помощью испытуемого НР не обнаружены мутации, связанные с устойчивостью МБТ к RIF или INH, среди образцов, в которых мутации не выявлены с помощью набора сравнения. Данные показатели были рассчитаны суммарно для всех видов биологического материала человека и отдельно для культур МБТ, для каждого противотуберкулезного препарата отдельно. Доверительные интервалы (ДИ 95%) рассчитывали по методу Клоппера и Пирсона [3].

Основные результаты. Среди 251 исследованной пробы ДНК из образцов биологического материала человека, содержащей ДНК МБТ, мутация в гене *rpoB*, связанная с устойчивостью МБТ к RIF, была выявлена в 121 пробе и испытуемым НР, и наборами сравнения: мутация S531L (N=108), в области кодона 526 (N=5), кодона 516 (N=4) и др.

В 130 пробах ДНК мутации в гене *rpoB* не были обнаружены ни одним из наборов. Таким образом, ПСП выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к RIF, составило 100 % (ДИ 95%: 97,00–100%), ОСП — 100 % (ДИ 95%: 97,20–100%).

Мутации в гене *katG* и (или) промоторной области гена *inhA*, связанные с устойчивостью МБТ к INH, обнаружены в 119 пробах ДНК из биологического материала человека с использованием испытуемого НР и наборов сравнения. В 132 пробах ДНК мутации не выявлены ни в гене *katG*, ни в промоторной области гена *inhA* ни одним из наборов. Следовательно, ПСП выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к INH, составило 100 % (ДИ 95%: 96,95–100%), ОСП — 100 % (ДИ 95%: 97,24–100%).

Среди 101 исследованной пробы ДНК культур МБТ в 51 пробе ДНК была выявлена мутация в гене *rpoB*, связанная с устойчивостью МБТ к RIF, и испытуемым НР, и набором сравнения: мутация S531L (N=37), в области кодона 526 (N=5), кодона 516 (N=6) и др. В 50 пробах ДНК мутации в гене *rpoB* не обнаружены ни одним из наборов реагентов. Таким образом, ПСП выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к RIF, составило 100 % (ДИ 95%: 93,02–100%), ОСП — 100 % (ДИ 95%: 92,89–100%).

Мутации в гене *katG* и (или) промоторной области гена *inhA*, связанные с устойчивостью МБТ к INH, выявлены в 50 пробах ДНК культур МБТ всеми наборами реагентов. В 51 пробе ДНК культур МБТ мутации не обнаружены ни в гене *katG*, ни в промоторной области гена *inhA* ни одним из наборов реагентов. Следовательно, ПСП выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к INH, составило 100 % (ДИ 95%: 92,89–100%), ОСП — 100 % (ДИ 95%: 93,02–100%).

Дискордантных результатов не выявлено ни в одном случае.

Выводы. В результате проведенных дорегистрационных клинических испытаний нового НР «АмплиТест® МБТ-Резист-I Луо» получено полное совпадение результатов и высокие показатели его эффективности (ПСП и ОСП — 100% соответственно) относительно наборов сравнения при выявлении мутаций, связанных с устойчивостью МБТ как к RIF, так и к INH, как для образцов биологического материала человека (мокроты, БАЛ, биоптата (операционного материала), мочи), так и для культур МБТ.

Литература:

1. Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. — 51 p.
2. Клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых» 2022 г. — М.: 2022. — 151 с.
3. Clopper C., Pearson E. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial // *Biometrika*. — 1934. — V. 26, № 4. — P. 404-413.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ РЕТИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ И ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Тхоренко Б.А.¹, Казуль Г.А.², Киприянова Н.А.², Пьянзова Т.В.¹, Лавряшина М.Б.¹

¹ ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава РФ (КемГМУ), Кемерово, Россия

² ГБУЗ Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр (КК ФПМЦ), Кемерово, Россия

Актуальность. Расширение и детализация представлений о молекулярных механизмах патогенеза туберкулеза легких (ТБ) и латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ) — задача, активно решаемая многочисленными научными группами во всем мире. За тысячелетия коэволюции с человеком микобактерии туберкулеза (*M. tuberculosis*) выработали изощренные механизмы иммунной эвазии и резистентности. Исследования географии и трансмиссивности отдельных генетических линий *M. tuberculosis* свидетельствуют о том, что они обладают специфическим спектром патоген-

ных стратегий, заражающими преимущественно людей определенной популяции или происхождения [Stucki et al., 2016]. В основе данного явления может лежать адаптация бактерий к особенностям иммунного реагирования организма хозяина, детерминированного на генетическом уровне и связанного с распространенностью в популяции определенного спектра полиморфных вариантов генов, кодирующих иммунологически значимые признаки. Перспективным объектом в этом плане являются гены, связанные с сигнальными путями, контролирующими экспрессию генов иммунного ответа. Одним

из таковых являются гены ретиноидных рецепторов (RXR, retinoid X receptor). Гетеродимеризуясь с рецептором витамина D (VDR, vitamin D receptor) и рецептором оксистеролов (LXR, liver X receptor) RXR обеспечивают их высокоаффинное связывание с соответствующими элементами ДНК и, тем самым, влияют на транскрипционную активность генов.

Цель исследования: проанализировать частоты полиморфных вариантов генов RXRA (rs9409929, rs3132299, rs877954) и RXRG (rs2651860, rs283696) в группах пациентов с латентной туберкулезной инфекцией и туберкулезом легких.

Материалы и методы. Обследовано 130 пациентов ГБУЗ Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр (Кемерово, Россия). У 48 из них диагностирована латентная туберкулезная инфекция и у 82 туберкулез легких. Диагноз ЛТИ выставлен на основании результатов туберкулинодиагностики с использованием пробы с АТФ — «Диаскинтест» («Генериум», Россия). Диагноз ТБ — на основании данных иммунодиагностики (проба Манту и проба с АТФ), рентгенологического исследования и компьютерной томографии, лабораторных, в том числе бактериологических и молекулярно-генетических методов исследования. В качестве группы сравне-

ния привлечен популяционный контроль (n=96, жители г. Кемерово). При формировании выборок учитывалась национальность — к исследованию приглашалось русское население региона.

ДНК из образцов крови выделяли методом фенол-хлороформной экстракции, генотипирование проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием наборов, синтезированных «ДНК-синтез» (г. Москва). По результатам генотипирования рассчитывали генотипические, аллельные частоты. Для анализа распределения аллелей и генотипов использовали критерий χ^2 . Соответствие наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому оценивали при помощи критерия χ^2_{n-w} . Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Исследование проведено в соответствии с Хельсинской декларацией под контролем локального этического комитета ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава РФ.

Результаты. Распределение генотипов во всех исследованных группах соответствовало закону Харди-Вайнберга. Генотипические и аллельные частоты (таблица) по изученному спектру полиморфных вариантов генов RXRA и RXRG у русских обладали особенностями по сравнению с частотами характерными для населения Европы (данные dbSNP, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp).

ТАБЛИЦА. ЧАСТОТЫ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ RXRA (rs9409929, rs3132299, rs877954) И RXRG (rs2651860, rs283696) В ИССЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ

SNP	Аллели	Европа	Популяционный контроль	ЛТИ	ТБ
rs9409929	G	0.659	0.569	0.630	0.562
	A	0.341	0.431	0.370	0.438
rs3132299	C	0.174	0.157	0.197	0.177
	G	0.826	0.843	0.803	0.823
rs2651860	A	0.800	0.817	0.776	0.784
	C	0.200	0.183	0.224	0.216
rs877954	A	0.341	0.302	0.344	0.317
	G	0.659	0.698	0.656	0.683
rs283696	T	0.214	0.247	0.187	0.197
	C	0.786	0.753	0.813	0.803

Обращает на себя внимание, что частоты rs9409929 и rs877954 у пациентов с ЛТИ, а также rs3132299 при ТБ оказываются близки общеевропейским и отличаются от популяционного контроля (русских Сибири). В отношении исследованности rs9409929, rs3132299, rs877954, rs2651860, rs283696 у русских — литературные данные есть только по rs2651860 [Triska et al., 2017]. Поэтому полученные в этой части результаты обладают новизной и представляют несомненный интерес.

Сравнение частот генотипов и аллелей групп ЛТИ и ТБ с популяционным контролем статистически значимых различий не выявило, что может быть связано с недостаточным объемом выборок. Тем не менее, показаны неко-

торые особенности характера распределения полиморфных вариантов генов RXR. Так, обращает на себя внимание rs283696 в гене RXRG. Данный полиморфный вариант локализован в 9 интроне гена (6 пн от начала). Такое расположение нуклеотидной замены может оказать влияние на процесс сплайсинга и в конечном итоге на структуру мРНК. Частота предкового аллеля Т оказалась выше в группе популяционного контроля (0.247) по сравнению с группой ТБ (0.197) и ЛТИ (0.187).

Выводы. Исследование не продемонстрировало значимых отличий частот генотипов и аллелей изученных полиморфных вариантов генов ретиноидных рецепторов при туберкулезе легких и латентной туберкулезной инфекции,

что может быть связано с недостаточным объемом выборок. Выявлены особенности генетической структуры русского населения по сравнению с общеевропейскими частотами.

Конфликт интересов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материал подготовлен за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-25-20209, <https://rscf.ru/project/22-25-20209> и Министерства науки и высшего образования Кузбасса.

Список литературы.

Stucki D., Brites D., Jeljeli L. et al. Mycobacterium tuberculosis lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. // Nat Genet. 2016 Dec;48(12):1535-1543. doi: 10.1038/ng.3704.

Triska P., Chekanov N., Stepanov V. et al. Between Lake Baikal and the Baltic Sea: genomic history of the gateway to Europe. // BMC Genet. 2017 Dec 28;18(Suppl 1):110. doi: 10.1186/s12863-017-0578-3.

АНАЛИЗ МИНИСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ИЗОЛЯТОВ MYCOBACTERIUM BOVIS/M. CAPRAE В БОЛГАРИИ

Терентьева Д.Р.¹, Савова-Лалковска Т.², Димитрова А.², Боновска М.³, Мокроусов И.В.¹, Вылчева В.³

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² Национальный диагностический и исследовательский ветеринарный медицинский институт им. проф. Г. Павлова, София, Болгария

³ Институт микробиологии им. Стефана Ангелова, Болгарская академия наук, София, Болгария

Введение. Туберкулез крупного рогатого скота, вызываемый *Mycobacterium bovis* или *M. caprae*, является важным зоонозным заболеванием, оказывающим серьезное влияние на мировое животноводство. Для реализации мер по надзору и контролю за этим заболеванием необходимы надежные инструменты, обладающие достаточной дискриминационной способностью для отслеживания конкретных клонов и клональных кластеров патогена, а также для изучения его передачи.

Целью исследования была оценка разнообразия минисателлитных локусов VNTR (variable number of tandem repeats) среди изолятов *M. bovis*/*M. caprae* в Болгарии и их анализ в контексте глобального разнообразия *M. bovis*.

Материалы и Методы. Всего было изучено 43 изолята *M. bovis*/*M. caprae*, полученных от крупного рогатого скота в различных фермах Болгарии в 2015-2021 гг. Штаммы были типированы по 13 VNTR-локусам. Для 34 изолятов было проведено полногеномное секвенирование (whole genome sequencing, WGS). Полученные данные обрабатывались с помощью филогенетических и статистических методов. Онлайн-ресурс MIRU-VNTRplus (<https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>) использовался для построения дендрограмм UPGMA и минимального связующего дерева (MST). Аллели VNTR рассматривались как дискретные переменные. Индекс Хантера-Гастона (HGI) использовался для оценки разнообразия отдельных локусов и дискриминации по различным комбинациям VNTR и рассчитывался с помощью ресурса http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php.

Онлайн-инструмент SAM-TB (<https://samtb.uni-medica.com/index>) использовали для определения SNP и филогенетического анализа полногеномных данных. Сгенерированный конкатенированный файл fasta также использовали для построения сети с помощью программы PHYLOViZ (<https://online.phyloviz.net/index>).

Результаты. Ветви *M. bovis* и *M. caprae* были четко разделены на филогенетическом дереве VNTR. Более крупная и географически рассредоточенная группа *M. caprae* была более разнообразной, чем группа *M. bovis*. (Индекс Хантера-Гастона HGI 0,67 против 0,60). В целом было выделено шесть кластеров (от 2 до 19 изолятов) и девять уникальных профилей (HGI по всем локусам 0,79). Локус QUB3232 оказался наиболее дискриминирующим (HGI 0,64). MIRU4 и MIRU40 были мономорфными, а MIRU26 — почти мономорфным. Четыре локуса (ETRA, ETRB, Mtub21 и MIRU16) позволяли выявить различия только между *M. bovis* и *M. caprae*. Сравнение с опубликованными данными VNTR из 11 стран показало, что некоторые локусы были однородными в пределах одного региона, но аллели различались в разных регионах (странах). Как и в нашем исследовании, анализ глобальной коллекции данных VNTR из Франции, Испании, Португалии, Италии, Северной Ирландии и Бельгии выявил QUB3232 и MIRU4 в качестве наиболее и наименее дискриминирующих локусов, соответственно. Локус Mtub21 показал различие в значениях HGI от 0,36 до 0,50 в Болгарии и Турции, соответственно, и практически полное отсутствие разнообразия в Бразилии и Мозамбике. Кроме того, неоднородные и контрастные значения HGI наблюдались для ETRC и QUB11b. Было построено филогенетическое дерево на основе данных VNTR по 13 локусам из 12 стран. В итоговое дерево были включены только основные типы из соответствующих стран: 271 тип, включающий 916 изолятов. Большинство ветвей итогового филогенетического дерева включало изоляты из одной страны (Болгарии, Италии, Португалии, Польши, Туниса или Мексики), что может отражать преимущественно локальную эволюцию эндемичных клонов. Всего 34 изолята с данными VNTR и WGS были использованы для сравнения методов: 13-VNTR (HGI = 0,71) и WGS (все изоляты были уникальными, но некоторые различались только по 1–3 SNP). На дереве, построенном на основе WGS, было шесть кластеров,

которые включали в себя суммарно 18 изолятов. Они состояли из пяти кластеров изолятов *M. caprae* и одного кластера изолятов *M. bovis*.

Заключение. Шесть локусов могут быть рекомендованы для первичного генотипирования изолятов *M. bovis/M. caprae* в Болгарии: ETRC, QUB11b, QUB11a, QUB26,

QUB3232 и MIRU10 (HGI 0,77). VNTR-типирование на основе ограниченного числа локусов представляется полезным для первичного эпидемиологического надзора за туберкулезом, но не для отслеживания недавней передачи, для которой требуется метод WGS с высоким разрешением.

УНИФИЦИРОВАННАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО КОМПЛЕКСА: ОТ ФИЛОГЕНОМИКИ К КЛИНИКЕ

Шитиков Е.А., Беспятых Д.А., Зайчикова М.В.

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Введение. Микобактерии туберкулезного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis* complex, МТВС) — группа тесно взаимосвязанных видов и подвидов кислотоустойчивых бактерий, способных вызывать туберкулез. Согласно геномным данным, однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) и делеции в так называемых регионах различий (RDs) считаются наиболее надежными маркерами для филогенетического анализа и дифференциации изолятов МТВС.

Цель. Целью настоящего исследования было предложить унифицированную классификацию МТВС на уровне SNPs и RDs с последующим рассмотрением эндемичного кластера *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148.

Материалы и методы. В исследование были включены данные полногеномного секвенирования более 10000 образцов МТВС из баз данных NCBI и ENA (58 различных исследований). Чтения были обработаны с использованием программного пакета Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>). Геномы *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3) и *M. canettii* (NC_015848.1) были использованы в качестве референсных. Филогенетические деревья строили с использованием RAxML-NG (v.1.0.1) (GTR+G модель). Видовую дифференциацию образцов внутри МТВС устанавливали с помощью утилиты snpit (v.1.0.0). Унифицированную классификацию по SNPs и список всех возможных RDs составляли на основе 12 и 24 независимых исследований соответственно.

Основные результаты. В ходе обобщения литературных данных и анализа результатов полногеномного секвенирования была предложена унифицированная классификация *M. tuberculosis* филогенетических линий L1-L9, а также полиморфизмы для идентификации представителей *M. caprae*, *M. bovis*, *M. orygis*, *M. microti* и *M. pinipedii*. Классификация подразумевает иерархическое деление на

пять филогенетических уровней и включает анализ по 213 полиморфизмам в автоматическом режиме. Для проведения дифференциации было разработано веб-приложение TBgen (<https://tb-gen.streamlit.app/>).

Для поиска RDs из каждой филогенетической единицы было отобрано по 10 (максимальное количество, если геномов меньше) образцов. В результате в наборе данных из 721 образца было обнаружено 14 тысяч делеций. Сравнение делеций со списком всех ранее описанных RDs (n=170) показало специфичность 79 RD на уровне вида, линии или подлинии (17 делеций были описаны впервые), а также высокую сходимость с результатами SNP-анализа. Для обнаружения делеций у видов МТВС была разработана утилита RDscan (<https://github.com/dbespiatykh/RDscan>).

Разработанные подходы были использованы для поиска и описания представителей кластера Beijing B0/W148 (L2.2.M4.5), распространенного на территории России. На 720 образцах из 23 стран биоинформатическими методами было показано, что кластер образовался в 1963 году и претерпел две волны экспансии в конце 80х и 90х годов. Также было установлено, что широкому распространению способствовало накопление компенсаторных мутаций в геноме патогена.

Заключение. В исследовании предложена самая обширная и гибкая схема классификации МТВС, включающая 169 генотипов и 5 видов, адаптированных к животным. Кроме того, была показана сходимость номенклатур на уровне SNPs и RDs. Таким образом, результаты могут помочь более надежно связать генотип изолятов с филогенетической характеристикой и такими характеристиками, как частота лекарственной устойчивости, вирулентность, эффективность вакцинации и тяжесть заболевания.

Раздел 13. ФАРМАКОГЕНЕТИКА И ФАРМАКОГЕНОМИКА

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА МЕТАБОЛИЗМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА У ПАЦИЕНТОВ КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Абдрахманова С.А.¹, Фахрадиев И.Р.², Качиева З.², Жангазиева К.Х.¹, Туякова Н.С.¹, Саусакова С.Б.¹

¹ РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Астана

² НАО «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова», г. Алматы, Казахстан

Актуальность. Фармакогеномика занимает важное место в клинической практике. Для персонализированного и индивидуального подхода к лечению инфаркта миокарда исследование фармакогеномики на популяции становится важным шагом. Возможность корректировать дозы лекарственных препаратов на основе полученных результатов о генотипах, имеющих значимые полиморфизмы, дает более эффективно проводить лечение пациентов, в том числе, перенесших инфаркт миокарда.

Цель и задачи. Изучение распространенности генетических полиморфизмов, влияющих на чувствительность к лекарственным препаратам, у пациентов с инфарктом миокарда казахской популяции.

Материалы и методы исследования. В исследовании участвовали 510 пациентов, казахской национальности, с диагнозом инфаркта миокарда. Критериями исключения из исследования явились: пороки сердца, ишемическая кардиомиопатия, аутоиммунные заболевания, сахарный диабет, терминальные стадии почечной и печеночной недостаточности, онкологические заболевания. Возраст пациентов до 60 лет включительно на момент выставления диагноза первичный инфаркт миокарда, установленный в соответствии с критериями Европейского общества кардиологов.

Исследование проведено с разрешения Локальной этической комиссии НАО «Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова» (протокол №12 (118) от 28 сентября 2021 года). У пациентов, соответствующих критериям включения, получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Генотипы полиморфизмов, связанные с реакцией на антитромбоцитарные и антикоагулянтные препараты, были определены с использованием современных методов генетического анализа.

Основные результаты. Наиболее известными генами, участвующими в метаболизме варфарина, являются CYP2C9 и VKORC1, CYP4F2. Аллель гена CYP2C9*2 является вариантным аллелем, возникающий при изменении одного нуклеотида в гене. В результате исследования в казахской популяции преобладают генотипы BB и AB нормальных метаболизаторов и гетерозиготы AB пациентов, нуждающиеся в сниженных дозах варфарина.

Аллель CYP2C9*3 связан со сниженной активностью фермента. По данному полиморфизму в казахской популя-

ции доминируют генотипы AA, проявляющие нормальную активность фермента. Носителям аллеля C=BB необходимы более низкие дозы варфарина по сравнению с носителями генотипа AA, для гетерозигот AB также рекомендуются сниженная дозировка варфарина.

Носители CYP4F2 V433M (rs2108622 C> T) имеют сниженную функцию, что приводит к увеличению дозы варфарина примерно на 8%. В казахской популяции превалирует дикий тип аллеля G=C соответствующий генотипу BB, генотипам AB и AA необходимы более высокие дозировки варфарина.

Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) rs11676382 показал более высокие частоты генотипа CC у азиатов, чем у европеоидов (97,7% против 86,9%); пациентам носителям генотипов GG/CX rs11676382 (CG или GG), требовалась на 27% более низкая доза варфарина. В казахской популяции превалирующим генотипом выступает AA=CC данным индивидам необходимы заниженные дозировки варфарина для достижения антикоагуляционного эффекта по сравнению с генотипами AB и BB.

Заключение. Данные исследования предоставляют важную информацию для улучшения стратегии лечения ИМ. Выявлено, что генетические вариации в генах CYP2C9 и VKORC1 влияют как на чувствительность к варфарину, так и на вероятность рецидива.

Генетические вариации оказывают значительное влияние на обработку и эффективность препаратов, что позволяет корректировать дозировку, адаптировать лечение, исходя из индивидуальных особенностей организма пациента и персонализировать стратегию лечения.

В частности, у пациентов, с генотипами CYP2C92 и CYP2C93, наблюдался измененный метаболизм варфарина, что требовало снижения доз для лечения потенциальных осложнений, таких как кровотечение. Соответственно, различные вариации гена VKORC1 позволили получить представление о дифференциальной чувствительности к варфарину. Данные знания необходимы для оптимизации результатов лечения и минимизации рисков с учетом индивидуальных стратегий дозирования, которые основаны на генетических маркерах.

Адаптируя методы лечения в соответствии с генетическими признаками, исследование открывает возможности для более эффективных терапевтических подходов и улучшения самочувствия пациентов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках программно-целевого финансирования научно-технической программы «Национальная программа внедрения персонализированной и превентивной медицины в Республике Казахстан» (в части исследования инфаркта миокарда) (OR12165486). Финансирование предоставлено Министерством здравоохранения Республики Казахстан.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, генетический полиморфизм, фармакогеномика, варфарин, SNP.

Сведения об авторах:

1. Абдрахманова Сания Алишевна, РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Председатель Правления, кандидат медицинских наук, 010000, Республика Казахстан, г.Астана, ул. Керей Жанибек хандар, дом 10. e-mail: a.saniya@mail.ru, тел. сот.: 87015136752. Форма участия: опубликование тезиса.

2. Фахрадиев Ильдар Рафисович, доктор PhD, НАО «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова», заведующий лабораторией экспериментальной медицины НИИ фундаментальной и прикладной медицины им. Б. Атыбаева, 050000, г. Алматы, ул. Толе Би, дом 94, e-mail: ildariko@mail.ru, тел. сот.: +77075001190. Форма участия: опубликование тезиса.

3. Качиева Зульфия Сабиркызы, руководитель научной лаборатории «Центр коллективного пользования» НАО «Казахский национальный медицинский универси-

тет имени С.Д. Асфендиярова». 050000, г. Алматы, ул. Толе Би, дом 94, e-mail: kachieva@gmail.com, Форма участия: опубликование тезиса.

4. Жангазиева Куралай Хайдаровна, РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, заведующая отделом менеджмента научных исследований, магистр здравоохранения, 010000, г. Астана, ул. Керей Жанибек хандар, дом 10, e-mail: zhangazieva@mail.ru, магистр здравоохранения; тел. сот.: 87015260761. Форма участия: опубликование тезиса.

5. Туякова Нурлыгуль Сапарбековна — РГП на ПХВ «Научно — производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, менеджер отдела менеджмента научных исследований, кандидат медицинских наук, 010000, г. Астана, ул. Керей Жанибек хандар, дом 10, e-mail: nurtu@mail.ru, тел. сот.: 87015216524. Форма участия: опубликование тезиса.

6. Саусакова Сания Багланбаевна — РГП на ПХВ «Научно — производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, менеджер отдела менеджмента научных исследований, докторант НАО «Медицинский университет Астана», 010000, г. Астана, ул. Керей Жанибек хандар, дом 10; e-mail: saussakova.s@mail.ru, тел. сот.: +77051284462. Форма участия: опубликование тезиса.

СВЯЗЬ ТИПА МЕТАБОЛИЗМА, УРОВНЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИПСИХОТИКОВ В КРОВИ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ИЗОФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМА P-450 ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

Голубева Т.С.¹, Докукина Т.В.¹, Голоенко И.М.¹, Объедков В.Г.¹, Гребень Н.Ф.¹, Сергеев Г.В.², Бокуть О.С.², Походня Ю.Г.², Сяхович В.Э.³, Походня Е.Н.³

¹ Республиканский научно-практический центр психического здоровья, Минск, Республика Беларусь

² Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

³ Национальная антидопинговая лаборатория, Минск, Республика Беларусь

Актуальность. В медикаментозной терапии шизофрении используются антипсихотические лекарственные средства. Однако при их применении часто не достигается ожидаемый положительный клинический эффект. Повысить эффективность антипсихотической терапии возможно путем персонализированного подхода к лечению с использованием фармакогенетического тестирования и терапевтического лекарственного мониторинга. Для этого важно изучение связи полиморфизма фармакогенов с уровнем концентрации антипсихотиков в плазме крови.

Цель. Целью работы было изучение связи уровня концентрации антипсихотиков в плазме крови с индивидуальными фенотипическими и генетическими особенностями у пациентов с шизофренией в популяции Республики Беларусь.

Методы. В исследование было включено 93 человека с шизофренией (код по МКБ 10: F20) в возрасте от 18 до 60 лет (39,5±1,1 лет) с распределением по полу: 46 мужчин

(59,6%) и 51 женщина (40,4%). Пациенты получали лечение различными психотропными лекарственными средствами, среди которых наиболее часто применялся клозапин (62,4%) либо использовалось сочетание различных антипсихотиков (12,9%).

Уровень концентрации антипсихотиков в плазме крови у пациентов, включенных в исследование определяли согласно методике, включающей ацетонитрильную экстракцию и последующий анализ образцов с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Для определения наличия полиморфных локусов генов изоферментов цитохрома P-450 (CYP2D6*4, CYP2C19*2, CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*17, CYP1A2*F) использовали стандартные методики выделения нуклеиновых кислот с применением полимеразной цепной реакции.

Тестирование типа метаболизма (активный или нормальный, медленный, быстрый) с использованием метода терапевтического лекарственного мониторинга с примени-

ем амитриптилина в качестве тест-субстрата было проведено у 73 пациентов с шизофренией, включенных в исследование.

Основные результаты. Было установлено, что у 41 пациента (44,1%) величина концентрации антипсихотического лекарственного средства в плазме крови находилась в норме, у 32 человек (34,4%) — в субтерапевтическом диапазоне, у 20 человек (21,5%) — в токсическом диапазоне.

Медленный тип метаболизма по показаниям амитриптилиновой пробы был выявлен у 33 пациентов (45,2%), нормальный — у 37 пациентов (50,7%), быстрый — у 3 пациентов (4,1%). Анализ связи метаболического фенотипа с индивидуальными генетическими особенностями показал, что при назначении антипсихотиков в дозе ниже средней терапевтической нормальной концентрация в крови чаще наблюдалась у пациентов с медленным типом метаболизма (55,0%). При этом доля пациентов с нормальным типом метаболизма и достаточной концентрацией антипсихотиков в крови была значительно ниже (20,8%) ($\varphi=1,79$, $p<0,05$, критерий Фишера).

Необходимо отметить, что все пациенты с быстрым

типом метаболизма (3 человека) испытывали фармакорезистентность. У них установлена низкая концентрация антипсихотика в крови, а также носительство генотипов AA локуса *CYP1A2*1F* или TT локуса *CYP2C19*17*.

Аллели полиморфных локусов (*CYP2D6*4*, *CYP2C19*2*, *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*) различных фармакогенов изоферментов цитохрома P-450, ассоциированные с низкой функцией фермента (либо ее отсутствием) встречались в равной доле (50%) у пациентов, как с медленным, так и нормальным типом метаболизма.

Выводы. Таким образом, в результате проведенного исследования выявлена достоверная связь медленного типа метаболизма с нормальной концентрацией антипсихотиков в крови у тех пациентов, которым назначались дозы ниже средней терапевтической. Отмечается также связь носительства полиморфных локусов генов *CYP1A2*1F* и *CYP2C19*17* с фармакорезистентностью пациентов к терапии. Изучение достоверности данной связи требует увеличения объема выборки.

ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА МЕДЛЕННЫХ АЛЛЕЛЕЙ CYP2C9 СРЕДИ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ВЫБОРКИ ЖИТЕЛЕЙ НОВОСИБИРСКА

Комова Е.Г.

АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

Введение. Цитохромы P450 подсемейства 2C участвуют в биотрансформации порядка 20 % лекарственных препаратов. Семейство представлено несколькими белками — 2C8, 2C9, 2C19, 2C18. Но наиболее важным в отношении лекарственного метаболизма является *CYP2C9*, он экспрессируется в печени, почках, в меньшей степени в предстательной железе, яичниках и двенадцатиперстной кишке. Среди лекарственных соединений, метаболизируемых *CYP2C9* — антикоагулянты (S-варфарин, аценкомарол), нестероидные противовоспалительные препараты (целекоксиб, диклофенак, ибупрофен, индометацин, лорноксикам, мелоксикам, напроксен, пироксикам, флурбипрофен, супрофен, теноксикам), гипогликемический препарат толбутамид и другие. Ингибиторами *CYP2C9* являются миконазол, флуконазол, сульфаметоксазол, амиодарон, зафирлукаст и др. При комплексной терапии ингибиторами и субстратами *CYP2C9* возможно развитие НЛР, которые могут привести к фатальным событиям. Не говоря уже о снижении эффективности терапии жизненно важных препаратов.

Для цитохрома *CYP2C9* характерен полиморфизм, наиболее часто встречающиеся варианты «медленных» аллелей у европеоидов — *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3*, которые приводят к снижению ферментативной активности и к накоплению токсичной дозы ряда препаратов из-за их более медленного выведения. Так, при терапии антикоагулянтом варфарин необходимо учитывать генотип *CYP2C9* при назначении первоначальной и поддерживающей дозы препарата. У носителей медленных аллелей *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* варфарин выводится более длительно, а при назначении стандартной первоначальной дозы накаплива-

ется, что ведет к внутренним кровотечениям.

Целью работы было оценить распространение медленных аллелей *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* среди выборки взрослого населения г. Новосибирска.

Материалы и методы. Случайную выборку составили образцы цельной крови от добровольцев, подписавших согласие на исследование, жителей г. Новосибирска ($n=1067$ человек). ДНК выделяли с помощью набора «РеалБест ГенМаг» (РУ РЗН 2021/13841, АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), предназначенного для автоматического выделения на станции KingFisher Flex в 96-луночных планшетах. ПЦР проводили на амплификаторе CFX96 (BioRad, США). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения «РеалБест Диагностика», поставляемого вместе с набором «РеалБест Генетика *CYP2C9*2/CYP2C9*3*» (РУ РЗН 2017/6367).

Результаты. Частота распространения аллеля *CYP2C9*2* среди выборки 1067 человека составила 8,7 %. Носители гомозиготы *CYP2C9*2*2* (медленные метаболитаторы) были 8 человек. Частота аллеля *CYP2C9*3* составила 5,2 %, четверо оказались носителями аллеля в гомозиготном состоянии. Носителями двух аллелей (компаунд-гетерозиготы) **2*3* оказались 14 человек (1:76), что соответствует фенотипу медленного метаболитатора. Носителями гетерозиготных генотипов **2/N* и **3/N* оказались 169 и 104 человека соответственно. То есть каждый 4-й — носитель одного медленного аллеля, что соответствует фенотипу промежуточного метаболитатора. А каждый 41-й носитель двух медленных аллелей, что соответствует фенотипу медленного метаболитатора.

Заключение. Достаточно высокая частота встре-

чаемости медленных аллелей *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* (8,7 и 5,2 %, соответственно) должна настораживать клиницистов. Особенно важно обращать внимание на назначение комплексной лекарственной терапии, так как сочетание препаратов субстратов и ингибиторов *CYP2C9* может приводить к развитию токсических реакций, в том числе тяжелых состояний. Так, например, сочетание сульфаметок-

сазола и толбутамида приводит к тяжелой гипогликемии. А у носителей медленных аллелей НЛР могут быть более выраженными. Терапия может оказаться малоэффективной. Зная, что пациент является носителем медленных аллелей по *CYP2C9*, в некоторых случаях предпочтительно заменять препарат, особенно если это касается комплексной лекарственной терапии.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО ПОДХОДА К УПОТРЕБЛЕНИЮ КОФЕИН-СОДЕРЖАЩИХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ СПОРТСМЕНАМИ ЦИКЛИЧЕСКИХ И ИГРОВЫХ ВИДОВ СПОРТА

Морозик П.М.¹, Саванович И.И.², Малёваная И.А.², Румянцева В.Д.², Сухан Т.О.², Амелянович М.Д.¹, Шибеко О.В.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр спорта, Минск, Беларусь

Питание все чаще признается ключевым компонентом для достижения наивысших спортивных результатов, при этом как научные, так и практические аспекты персонализации спортивного питания активно развиваются, поскольку это направление позволяет существенно повысить индивидуальные спортивные возможности. Генетические особенности человека влияют на всасывание нутриентов, их метаболизм, усвоение и выведение. При составлении индивидуального рациона питания спортсменов все большую актуальность приобретает, благодаря которой возможна разработка более эффективных рекомендаций по выбору диеты.

Употребление кофеина широко распространено в спорте, и убедительная доказательная база демонстрирует его эргогенный эффект, известный уже более 100 лет. Положительные эффекты кофеина хорошо воспроизводятся как в упражнениях на выносливость, так и в упражнениях с повторяющимися усилиями высокой интенсивности. До 2004 года кофеин даже входил в список запрещенных препаратов Всемирного антидопингового агентства.

В ряде исследований показаны индивидуальные различия в работоспособности после приема кофеина у различных лиц и в различных видах спорта. Эти межличностные различия в реакции на кофеин могут быть объяснены полиморфными вариантами генов, вовлеченных в метаболизм кофеина. Первый этап биотрансформации кофеина опосредован печеночными микросомальными ферментами — селективный катализ цитохромом P450 в микросомах печени человека. Кофеин в основном метаболизируется в печени с помощью изофермента *CYP1A2* (примерно на 80%), что вызывает его деметилирование до основного метаболита — параксантина. Более того, сам кофеин может повышать активность *CYP1A2*, и этот изофермент также отвечает за деметилирование кофеина в теобромин и теофиллин с последующим ацетилированием с помощью N-ацетилтрансферазы-2 и окислением с помощью ксантиноксидазы (*CYP3A4*) с образованием основ-

ных метаболитов, которые выводятся в основном с мочой. Низкий процент (0,5–4,0%) принятой внутрь дозы кофеина выводится в неизменном виде с мочой и желчью, а также обнаруживается в слюне, сперме и грудном молоке.

Цель исследования — изучить ассоциацию вариантов генов, вовлеченных в метаболизм кофеина, с работоспособностью спортсменов циклических и игровых видов спорта.

Материалы и методы. Всего в исследование было включено 104 представителя циклических и игровых видов спорта. Объектом исследования служили образцы тотальной ДНК, выделенной из биологического материала (венозной крови) исследуемых групп спортсменов методом фенол-хлороформной экстракции. Молекулярно-генетическое тестирование осуществлялось методом ПЦР в реальном времени, в ходе которого определялись полиморфные локусы гена фермента цитохрома P450 (*CYP1A2* rs2472297 и rs762551), гена рецептора ароматического углеводородов (*AHR* rs4410790) и гена рецептора аденозина (*ADORA2A* rs571876). Во время каждой постановки ПЦР применяли положительный и отрицательный контроли, в целях контроля качества некоторые образцы, отобранные в случайном порядке, генотипировали повторно. Вся статистическая обработка результатов и построение графиков осуществлялись с использованием языка программирования R (<http://r-project.org>). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$ с поправкой на множественное тестирование с использованием коэффициента ложного обнаружения (p_{FDR}) по методу Бенджамини-Хохберга.

Результаты. В ходе исследований осуществлялось тестирование спортсменов в 2 этапа: на первом измерялась работоспособность в исходном состоянии и после нагрузки, а на втором — в исходном состоянии, после нагрузки и после нагрузки и употребления кофеина. Результаты анализа ассоциации полиморфных вариантов генов, вовлеченных в метаболизм кофеина, с показателями среднего значения времени реакции после нагрузки не позволили установить статистически значимой ассоциации. Однако по результа-

там тестирования после нагрузки с кофеином выявлена ассоциация полиморфного варианта гена ADORA2A rs5751876 с показателями среднего значения времени реакции. Так, у носителей генотипа Т/Т показатель среднего значения времени реакции статистически значимо ниже по сравнению с носителями референсного генотипа С/С (разница составила -24,5, 95% ДИ -44,4...-4,6, P=0,022). Ранее в исследованиях было показано, что носители генотипа Т/Т являются «высоко реагирующими на кофеин», в то время как носители генотипов и С/С и С/Т — «низко реагирующими на кофеин».

Анализ различий между показателями разницы среднего значения времени реакции, измеренных после нагрузки по сравнению с исходным состоянием, также позволил выявить ряд ассоциаций (таблица). На этапе после нагрузки без кофеина опять же не выявлено статистически достоверной ассоциации генетических локусов с показателями работоспособности. В то же время, среди носителей генотипа А/А по локусу rs2472297 и генотипа Т/Т — по rs762551 гена CYP1A2 после нагрузки с кофеином выявлена статистически достоверная ассоциация с показателями работоспособности.

ТАБЛИЦА. АНАЛИЗ АССОЦИИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ С ОТВЕТом НА НАГРУЗКУ И КОФЕИН (ДААННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ В ВИДЕ ИЗМЕНЕНИЯ РАЗНИЦЫ ПОКАЗАТЕЛЯ СРЕДНЕГО ЗНАЧЕНИЯ ВРЕМЕНИ РЕАКЦИИ, МС,

Ген, вариант	Состояние после нагрузки	P	Состояние после нагрузки с кофеином	P
CYP1A2 rs2472297	A/A, $\beta=4,9$ (-11,9...21,8)	0,69	A/A, $\beta=-12,7$ (-24,3...-1,1)	0,03
rs762551	T/T, $\beta=-3,8$ (-17,5...9,8)	0,21	T/T, $\beta=-28,7$ (-55,8...-1,7)	0,03
AHR rs4410790	G/G, $\beta=-3,5$ (-23,1...16,0)	0,89	G/G, $\beta=17,7$ (-0,2...35,6)	0,089
ADORA2A rs5751876	T/T, $\beta=0,5$ (-17,9...19,0)	0,85	T/T, $\beta=-4,5$ (-24,8...15,8)	0,81

ОТНОСИТЕЛЬНО РЕФЕРЕНСНОГО ГЕНОТИПА).

Отдельно стоит отметить, что для локусов гена CYP1A2 выявлена ген дозовая зависимость, характерная для классической модели наследования: для одного гомозиготного генотипа максимальный показатель работоспособности, для другого — минимальный, для гетерозиготного — промежуточный. Также были выявлены ряд аллельных комбинаций (гаплотипов) по всем четырем исследуемым генам, статистически значимо ассоциированным с показателями среднего значения времени реакции. Анализ аллельных

комбинаций позволяет более эффективно интерпретировать результаты генотипирования.

Заключение. Персонализированные рекомендации по употреблению кофеина на основании индивидуального генетического профиля позволяют адаптировать программы тренировок в разных видах спорта с целью максимизации потенциального эргогенного эффекта и повышения работоспособности, а также сохранения здоровья спортсменов.

РИФАМПИЦИН СНИЖАЕТ УРОВЕНЬ miR-let-7b В ГИППОКАМПе У ДЛИТЕЛЬНО АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ КРЫС

Ереско С.О.^{1,3}, Шамаева С.А.^{1,2}, Айрапетов М.И.^{1,4}

¹ Институт экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, г. Санкт-Петербург

³ СЗГМУ им. И.И. Мечникова, г. Санкт-Петербург

⁴ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, г. Санкт-Петербург

Введение. Хроническое употребление алкоголя является причиной различных структурных и функциональных изменений нервной ткани головного мозга. Литературные данные свидетельствуют об изменениях в содержании молекул микро-РНК в ряде структур головного мозга при остром и длительном поступлении этанола в организм. Микро-РНК (miR) — класс малых некодирующих РНК, которые влияют на экспрессию белка в клетке, нацеливаясь на матричные РНК (мРНК). Найдены данные о связи miR-let7b с нейродегенеративными процессами, наблюдаемыми в ЦНС, в условиях длительной алкоголизации. Однако уровень её содержания в гиппокампе (*Hippocampus*, *Hipp*) на модели длительной алкоголизации ранее не оценивался.

Рифампицин (Rif) — антибиотик, относящийся к группе ансамицинов, снижает процессы нейровоспаления и нейродегенерации. Одна из задач нашего исследования — оценить влияние Rif на состояние исследуемых нами miR.

Цель: оценить содержание miR-let7b в *Hipp* крыс в условиях и при фармакологической коррекции Rif

Материалы и методы. Моделирование хронической алкоголизации осуществлялось посредством внутрижелудочного введения 20%-го раствора этанола (2 г/кг, ежедневно) в течение 1 мес. Контрольной группе вводилась вода. Введение Rif (100 мг/кг) осуществлялось внутримышечно однократно. Образцы мозга изымали на последние сутки алкоголизации, а также на 7-е сут. отмены алкоголя,

мгновенно замораживали. Суммарную РНК выделяли посредством Extract RNA (Евроген, РФ). Полиаденилирование выполнено с помощью поли(А)-полимеразы E.coli (New England Biolabs Inc., США). Обратная транскрипция выполнена с использованием «MMLV RT kit» (Евроген, РФ). ПЦР в реальном времени проводили в 10 мкл смеси, которая включала в себя SYBR Green MIX (Евроген, РФ) и специфические праймеры (BioVeagle, РФ). Данные были посчитаны методом 2 $\Delta\Delta$ Ct, статистически обработаны.

Результаты. Длительная алкоголизация привела к снижению уровня miR-let7b в 1,81 раза. Выполненная инъекция Rif привела к снижению уровня miR-let7b в 1,36 раза

по сравнению с группой, получавшей в виде инъекций изотонический раствор натрия хлорида.

Выводы. Хроническая алкоголизация снижает уровень исследуемой нами молекулы miR-let7b в Hipp головного мозга крыс. Выполненная нами инъекция Rif так же снизила уровень miR-let7b. Механизмы действия miR и Rif на молекулярные пути развития нейровоспалительного процесса остаются неясными, но дальнейшее исследование влияние Rif может позволить найти мишени для фармакологической коррекции. Так же представляется интересным изучить взаимосвязь miR и Rif с сигнальными путями toll-подобных рецепторов (TLR7 и TLR4).

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА ABC-ТРАНСПОРТЕРОВ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМАХ ХИМИОТЕРАПИИ

Кипень В.Н.¹, Добыш О.И.¹, Ходоронок Е.И.², Хоров А.О.², Лемеш В.А.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, аг. Лесной, Беларусь

Введение. «Фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) при раке молочной железы (РМЖ) связывают с функционированием продуктов генов семейства ABC-транспортеров (ATP-Binding Cassette), их работу считают мажорным механизмом лекарственной устойчивости [1]. В опухолевых клетках ABC-транспортеры осуществляют выброс цитостатических препаратов, таргетных (лапатиниб, иресса, софатиниб, герцептин, акситиниб и др.) и гормональных средств из опухолевых клеток против градиента концентрации с затратой энергии АТФ [2, 3]. Роль генов ABC-транспортеров в формировании фенотипа предсуществующей и адаптивной МЛУ была доказана в опытах *in vitro* по их трансфекции в чувствительные к цитостатикам линии клеток и в экспериментах по индукции экспрессии ABC-транспортеров в

клетках, которые в результате этого оказывались устойчивыми к химиопрепаратам. В клинической ситуации, в отличие от экспериментов *in vitro* на клеточных линиях, происходит активный процесс становления МЛУ при лечении, на который оказывают влияние факторы организма и опухоли.» [4].

Современный подход дозирования лекарств при неoadъювантной (предоперационной) химиотерапии (НАХТ) должен учитывать индивидуальную способность пациента метаболизировать назначаемый химиопрепарат, что позволит достичь максимального противоопухолевого эффекта и свести к минимуму побочные явления индукционной терапии. В качестве потенциальных биомаркеров эффективности НАХТ могут выступать полиморфизмы в генах семейства ABC-транспортеров, влияющие на активность или на

Полиморфизм	Ген	Генотип	Кол-во пациентов	Частота генотипа, %
rs2235035	ABCB1	AA	19	12,67
		AG	77	51,33
		GG	54	36,00
rs17205838	ABCC1	CC	8	5,33
		CG	43	28,67
		GG	99	66,00
rs4919395	ABCC2	AA	28	18,67
		AG	63	42,00
		GG	59	39,33
rs2231137	ABCG2	CC	142	94,67
		CT	8	5,33
		TT	—	—

экспрессию мишени для лекарственного средства.

Цель и задачи. Оценить частоту распространенности генотипов по ABCB1 (rs2235035), ABCC1 (rs17205838), ABCC2 (rs4919395) и ABCG2 (rs2231137) среди пациентов с раком молочной железы (РМЖ), которым проводилась неoadъювантная химиотерапия (НАХТ).

Материалы и методы. Материалом для молекулярно-генетических исследований являлась венозная кровь 150 пациентов с клинически верифицированным диагнозом злокачественное новообразование молочной железы (МКБ-10 C.50). Венозная кровь отбиралась в пробирки с цитратом натрия 3,8% Citrate (9NC 0,129M) IMPROVE. Для выделения ДНК из лейкоцитов отбирали аликвоту в 100 мкл, остаток хранили при -20 оС. Забор крови осуществляли сотрудники РНПЦ онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова (аг. Лесной, Республика Беларусь). ДНК выделяли из цельной крови с использованием набора «ArtДНК MiniSpin Эксперт» (ООО «АртБиоТех», Беларусь). Для установления аллельного состава генов ABCB1 (rs2235035), ABCC1 (rs17205838), ABCC2 (rs4919395) и ABCG2 (rs2231137) использовали наборы праймеров KASP by Design Primer Mix (LGC, Biosearch Technologies), содержащие аллель-специфичные праймеры для каждого исследуемого полиморфизма.

Основные результаты. В таблице приведены полученные результаты. Выявлено, что для rs2235035 (ABCB1) частота минорного аллеля А составила 38,33% (95% ДИ 32,71-43,95), для rs17205838 (ABCC1) аллель С — 19,67% (95% ДИ 15,07-24,27), rs4919395 (ABCC2) аллель А — 39,67% (95% ДИ 34,01-45,33), rs2231137 (ABCG2) аллель Т — 2,67% (95% ДИ 0,81-4,53).

Показано, что при сравнении с популяционными данными, полученными в рамках крупномасштабного проекта 1000Genomes для популяции «Еuroре» наибольшие отклонение частоты распространенности минорных аллелей были характерны для rs2235035 и rs4919395 — 7,37%

и 4,01% соответственно. Наличие трех и более минорных аллелей по исследуемым полиморфизмам было выявлено у 16,0% пациентов, четырех — у одного пациента.

Заключение. Промежуточная оценка ассоциации частоты распространенности аллельных вариантов генов с молекулярным подтипом опухоли не выявила статистически значимых различий. Разработан «Протокол проведения KASP-генотипирования для генов семейства ABC-транспортеров» (Решение Ученого совета Института генетики и цитологии НАН Беларуси от 01.11.2022, протокол №7). В дальнейшем планируется продолжить молекулярно-генетические исследования (увеличение объема выборки до 215 человек), а также провести расширенный ассоциативный анализ с клинико-морфологическими характеристиками опухоли при НПХТ для пациентов с РМЖ.

Исследование выполнено в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма 3.2 «Геномика, эпигеномика, биоинформатика» на 2021-2025 гг., задание «Роль полиморфных вариантов ряда генов, ассоциированных с метаболизмом лекарственных средств, в формировании противоопухолевого ответа на неoadъювантную химиотерапию при раке молочной железы» на 2021-2023 гг.

Литература:

1. Targeting MDR in breast and lung cancer: Discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies / L. Amiri-Kordestani [et al.] // Drug Resistance Updates. 2012. Vol.15. pp.50-61.

2. Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice / K. Eechoute [et al.] // Clinical Cancer Research. 2011. Vol.17(3). pp. 406-415.

3. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance / J.D. Allen [et al.] // Cancer Research. 2000. Vol.60(20). pp. 5761-5766.

4. Регуляция экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии / Н.В. Литвяков // Автореферат диссертации. 2014. Томск, Россия.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ABCB1 И CYP1B1 АССОЦИИРОВАН С РАЗВИТИЕМ КАРДИОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОМПЛЕКСНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кипень В.Н.¹, Добыш О.Г.¹, Черневская М.В.², Черняк С.В.², Павлова О.С.², Ковш Е.В.², Лемеш В.А.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² РНПЦ «Кардиология», Минск, Беларусь

Введение. Развитие сердечно-сосудистых заболеваний относится к наиболее частым побочным эффектам химиотерапии при лечении пациентов с раком молочной железы (РМЖ) и является результатом кардиотоксичности, которая включает непосредственно действие противоопухолевых препаратов и их метаболитов на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы. Полностью объяснить индивидуальную восприим-

чивость пациента к химиотерапии только посредством клинических и инструментальных исследований не представляется возможным.

При лечении РМЖ наиболее часто используются антрациклины, алкилирующие агенты, таксаны, которые могут вызывать одно из наиболее тяжелых сердечно-сосудистых осложнений (ССО) противоопухолевой терапии — систолическую дисфункцию левого желудочка (ЛЖ),

сердечную недостаточность и потенциально фатальные нарушения ритма сердца. Смертность пациентов, у которых развилась сердечная недостаточность на фоне лечения РМЖ, достигает 60 % в течение двух лет. Данные, полученные на протяжении последних десятилетий, показывают, что кардиотоксичность — широко распространенное явление, значимость которого остается недооцененной.

Молекулярно-генетический анализ полиморфных вариантов генов, вовлеченных в метаболизм и транспорт химиотерапевтических лекарственных препаратов, призван улучшить оценку данных рисков [1-6].

Цель и задачи. Определить частоту распространенности минорных аллелей для SNP (Single Nucleotide Polymorphism) генов *ABCC1* и *CYP1B1*, ассоциированных с эффективностью метаболизма лекарственных средств с учетом кардиотоксичности, у пациентов с РМЖ из Республики Беларусь.

Материалы и методы. В группу исследования вошли 62 пациента с первично-операбельным раком молочной железы I-II ст., на фоне проведения неоадьювантной и/или адьювантной полихимиотерапии с применением лекарственных средств антрациклинового и таксанового ряда. Диагноз РМЖ был подтвержден гистологически. Биологический материал (венозная кровь) был предоставлен сотрудниками РНПЦ «Кардиология».

Генотипирование проводили по rs17205838 (*ABCC1*, Chr.16:16046184G>C) и rs1056836 (*CYP1B1*, Chr.2:38071060G>C) с использованием технологии KASP (Competitive allele specific PCR, <https://www.biosearchtech.com/>). Хромосомная позиция соответствует сборке генома человека GRCh38.p14 (GCF_000001405.40). Статистический анализ проведен с использованием SPSS v.20.

Основные результаты. Для 33,87% пациентов с РМЖ в исследуемой выборке было отмечено наличие кардиотоксических эффектов при проведении комплексного противоопухолевого лечения химиотерапевтическими средствами антрациклинового и таксанового ряда. Были отмечены кардиомиопатия (КМП), артериальная гипертензия (АГ), миокардит, перикардит, фиброз, нарушение сердечного ритма. С повышенной вероятностью развития кардиотоксических эффектов при проведении комплексного противоопухолевого лечения пациентов с РМЖ были ассоциированы SNP rs17205838 и rs1056836.

Частота распространенности аллеля С для rs17205838 в подгруппе пациентов с РМЖ с кардиотоксическими эффектами составила 28,57%, в подгруппе без кардиотоксических эффектов — 15,85%. Различия

оказались статистически значимыми на уровне тенденции ($p=0,095$). В то же время, частота генотипа GC в подгруппе пациентов с РМЖ с кардиотоксическими эффектами составила 57,1%, или в 2,59 раза больше, чем в подгруппе без кардиотоксических эффектов ($p=0,014$).

Частота генотипа CC для rs1056836 в подгруппе пациентов с РМЖ с кардиотоксическими эффектами составила 38,1%, или в 3,89 раза больше, чем в подгруппе без кардиотоксических эффектов ($p=0,022$). В то же время, частота распространенности аллеля С для rs1056836 в подгруппе пациентов с РМЖ с кардиотоксическими эффектами составила 54,76%, в подгруппе без кардиотоксических эффектов — 40,24%, однако различия оказались статистически не значимыми.

Заключение. Показано, что для rs17205838 и rs1056836 имеются статистически значимые ассоциации с наличием/отсутствием осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы среди пациентов с раком молочной железы при проведении комплексного противоопухолевого лечения.

Исследование выполнено в рамках проекта БРФФИ M22-071 «Фармакогенетические особенности кардиотоксических эффектов при проведении комплексного противоопухолевого лечения химиотерапевтическими средствами антрациклинового и таксанового ряда» 2022-2024 гг.

Литература:

1. Pharmacogenomic prediction of anthracycline-induced cardiotoxicity in children / H. Visscher [et al.] // Clin. Oncol. 2012. V.30(13). pp.1422-1428.
2. Validation of variants in SLC28A3 and UGT1A6 as genetic markers predictive of anthracycline-induced cardiotoxicity in children / H. Visscher [et al.] // Pediatr. Blood Cancer. 2013. V.60(8). pp.1375-1381.
3. A coding variant in RARG confers susceptibility to anthracycline-induced cardiotoxicity in childhood cancer / F. Amineng [et al.] // Nat. Genet. 2015. V.47(9). pp.1079-1084.
4. CELF4 Variant and Anthracycline-Related Cardiomyopathy: A Children's Oncology Group Genome-Wide Association Study / X. Wang [et al.] // J. Clin. Oncol. 2016. Vol.34(8). pp.863-870.
5. Clinical and Genetic Determinants of Cardiomyopathy Risk among Hematopoietic Cell Transplantation Survivors / K.J. Leger [et al.] // Biol. Blood Marrow Transplant. 2016. Vol.22(6). pp.1094-1101.
6. Genome-Wide Association Study for Anthracycline-Induced Congestive Heart Failure / B.P. Schneider [et al.] // Clin. Cancer Res. 2017. Vol.23(1). pp.43-51.

Раздел 14. ГЕНЕТИКА МУЛЬТИФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОМПОНЕНТЫ НОРМАЛЬНОЙ ВАРИАбельНОСТИ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА В ПОЖИЛОМ ВОЗРАСТЕ

Бочарова А.В.¹, Вагайцева К.В.¹, Марусин А.В.¹, Макеева О.А.², Степанов В.А.¹

¹ НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Томск, Россия

² Центр клинических исследований Неббиоло, Томск, Россия

Введение. Россия находится в общемировом демографическом тренде глобального старения населения Земли. Активное старение населения началось в стране в середине XX в. и продолжается до сих пор. По данным Росстата, 24% от общей численности населения РФ приходится на людей старше трудоспособного возраста [1]. Старение является основным фактором риска многих заболеваний человека, включая когнитивные нарушения, от которых страдает большая часть пожилых людей. Снижение когнитивных функций с возрастом представляет собой огромную нагрузку на систему здравоохранения в развитых странах, включая Россию, постоянно растущую в течение последних десятилетий. Когнитивные функции в норме и при различных формах деменций, основной из которых является болезнь Альцгеймера (БА), демонстрируют высокий уровень наследуемости. При этом наиболее распространенная форма БА — БА с поздним началом — является многофакторным заболеванием, а когнитивные функции принадлежат к категории сложнаследуемых признаков. До сих пор генетическая составляющая вариабельности когнитивных признаков охарактеризована весьма слабо. Индивидуальная вариабельность когнитивных функций является важным эндотипом многих нейродегенеративных и психических заболеваний.

Цель и задачи. Целью данной работы был анализ генетической компоненты нормальной вариабельности когнитивных функций у индивидов из выборки пожилых лиц без установленных диагнозов нейродегенеративных и психических заболеваний.

Материалы и методы. Многоуровневый характер реализации генетической информации при развитии когнитивных эндотипов предполагает применение различных методов и подходов для анализа данных. В работе были применены современные методы молекулярно-генетического и статистического анализа. В качестве основного показателя когнитивных функций использовали общее значение (сумму баллов по всей батарее тестов) теста MoCA — Монреальской шкалы оценки когнитивных функций [2]. MoCA является основным глобальным скрининговым инструментом оценки когнитивных функций, разработанным специально для диагностики умеренных когнитивных нарушений по причине БА. Результат теста варьирует от 0 до 30 баллов; более высокий балл указывает на лучшие показатели состояния когнитивных функций. Для анализа ассоциаций генетических маркеров с когнитивными признаками

была сформирована мультиплексная панель из 62 SNP-маркеров. Было выполнено мультиплексное генотипирование 708 образцов из выборки лиц пожилого возраста без установленных диагнозов нейродегенеративных и психических заболеваний методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. Поиск маркеров, ассоциированных с когнитивными показателями, осуществляли в рамках двух подходов: 1) анализ ассоциаций когнитивных показателей с генетической вариабельностью в полной выборке пожилых людей; 2) анализ ассоциаций методом случай-контроль при сравнении первой квартили выборки (индивиды с максимальными значениями теста MoCA, более 25 баллов) с четвертой квартилью (индивиды с минимальными значениями MoCA, менее 20 баллов). Применяли три теста: параметрический ANOVA, непараметрический тест Краскела-Уоллеса и медианный тест. Для количественной оценки силы ассоциации генетического маркера со значениями когнитивных тестов MoCA мы провели расчет соотношения шансов (OR).

Основные результаты. Наиболее высокодостоверные связи со значениями MoCA демонстрируют генетические маркеры генов APOE (rs429358, rs769449), TOMM40 (rs2075650, rs157580) и PVRL2 (rs6857, rs6859), расположенные в одном локусе на хромосоме 19q13.32. rs4420638 гена APOC1 в этом же кластере также обнаруживает значимые ассоциации с когнитивными параметрами по данному дисперсионному анализу и теста Краскела-Уоллеса. Из других локусов генома отметим высокодостоверную ассоциацию со значениями MoCA rs2616984 гена CSMD1 и rs11218343 гена SORL1. Дисперсионный анализ показал, что доля дисперсии значений теста MoCA, объясняемая вариабельностью генетических маркеров, варьирует от 0.5% до 1.8% для каждого из ассоциированных SNP. Наибольший вклад (8.6%) в вариабельность показателя когнитивных функций вносят маркеры кластера генов APOC3-APOE-TOMM40-PVRL2. При сравнении частот аллелей у пожилых людей с высокими и низкими значениями MoCA обнаружены ассоциации для 11 SNP 8 генов: rs6859 и rs6857 гена PVRL2, rs157580 и rs2075650 гена TOMM40, rs429358 и rs769449 гена APOE, rs3772130 гена FBXO40, rs1021261 гена LUZP2, rs561655 гена PICALM, rs1635 гена NKAPL, rs4420638 гена APOC1. Обращает на себя внимание полное пересечение ассоциаций с таковыми, полученными при анализе MoCA как количественного признака во всей выборке для 7 маркеров кластера генов PVRL—TOMM40-APOE-APOC1. Также реплицированы ассоциации двух других маркеров (гены FBXO40 и LUZP2) и обнаружены

ассоциации для маркеров генов PICALM и NKAPL, не выявленные при анализе в предыдущем подходе. Для 10 из 11 маркеров OR оказались статистически значимыми, а максимальный показатель характерен для rs429358 гена APOE (OR = 2,00; 95% CI = 1,16-3,47, p = 0,0078).

Заключение. Результаты примененных подходов показывают, что наибольший вклад в вариабельность когнитивных функций у здоровых пожилых людей вносит локус сцепленных маркеров кластера генов PVRL-TOMM40-APOE-APOC1 на хромосоме 19. В то же время, компонента вариабельности когнитивных параметров в норме не ограничи-

вается генами и маркерами этого участка генома. К числу других генетических локусов нормальной вариабельности когнитивных функций, по данным проведенного анализа относятся локусы генов CSMD1, CNTNAP2 и ряд других. Изучение нормального когнитивного старения мозга может пролить свет на патологические процессы, приводящие к заболеваниям, снижающим когнитивные функции человека.

Список литературы:

1. <https://rosstat.gov.ru/folder/13877>
2. <http://www.mocatest.org/>

КОРРЕЛЯЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ СИНТЕЗ БЕЛКОВ ПРЕДИКТОРОВ СУИЦИДА, В КРОВИ И СЛЮНЕ

Глинкина Т.В., Костюк С.А., Руденкова Т.В., Полуян О.С., Лямцева А.К., Давидовский С.В.

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Введение. Среди генетических предикторов суицидального поведения выделяют такой фактор, как экспрессия генов белков, ассоциированных с суицидальным поведением. Именно экспрессия генов характеризует ответ генома на воздействие окружающей среды и влияет на формирование фенотипических признаков, которые могут обуславливать формирование суицидального поведения. В психиатрии не представляется возможным исследовать в целях обнаружения генетических маркеров головной мозг живого пациента, поэтому актуальной задачей является выявление генетических предикторов в крови или ином биологическом материале, полученном у живого пациента. При этом особый интерес представляет возможность исследования экспрессии генов в слюне, поскольку ее получение является неинвазивным. Для проведения исследования в данном направлении нами выбраны 2 гена, ответственных за синтез белков, ассоциированных с суицидальным поведением: ген белка SAT 1 (spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1) и ген белка SKA 2 (spindle and kinetochore associated complex subunit 2).

Цель: оценить корреляцию экспрессии генов белков SAT 1 и SKA 2 в крови и слюне лиц, предпринявших попытку суицида.

Материалы и методы. В качестве биологического материала для оценки экспрессии генов использовали кровь и слюну 57 лиц, предпринявших попытку суицида в возрасте от 25 до 71 года, 42 мужчины и 15 женщин (далее группа «Суицид»), а также кровь и слюну 84 лиц с расстройством адаптации в возрасте от 23 до 66 лет, 46 мужчин и 38 женщин (далее — группа «Расстройство адаптации», группа сравнения). Выделение РНК из слюны и крови осуществляли с применением реагента TRIzol и сорбирующих колонок (Invitrogen, США). При выявлении уровней экспрессии генов белков SAT 1 и SKA 2 проводили молекулярно-генетический анализ методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ ПЦР-РВ). Для этого после выделения РНК проводили реакцию обратной транскрипции (ОТ) с использованием набо-

ра SuperScript III обратная транскриптаза, дНТФ и Random Hexamers праймеров (Invitrogen, США). Полученную в результате обратной транскрипции кДНК использовали для постановки ПЦР-РВ с применением набора «Готовая смесь для ПЦР-РВ» (Праймтех, Республика Беларусь) и подобранных специфических праймеров и TaqMan проб к исследуемым генам белков SAT 1 и SKA 2, а также к референсному гену (house-keeping гену) белка GAPDH (Nolan T., 2006): SAT-1-5' — CACCCCTTTTACCACTGCCT — 3' (прямой праймер), SAT-1-5' — TGCCAATCCACGGGACATAG — 3' — (обратный праймер), SAT-1-5' — AGCACTGGACTCCGCAAGGACACAGCA — 3' — (проба); SKA-2-5' — ACAGGCTGGAATATGAAATCAAGAC — 3' (прямой праймер), SKA-2-5' — ATTGCTGTGCCGAGTTTTC — 3' — (обратный праймер), SKA-2-5' — TGATATGCCGCATTAACCCAGTTGCTGT — 3' — (проба); GAPDH — 5' — GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC — 3' (прямой праймер), GAPDH — 5' — CATGAGTCCTCCACGATACC — 3' — (обратный праймер), GAPDH — 5' — CCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCTG — 3' — (проба). Амплификацию проводили на приборе «Rotor — Gene 6000» (Corbett Research, Австралия). Программа амплификации: 1 цикл 95°C — 15 мин, 45 циклов 95°C — 15 с, 60°C — 60 с. После завершения ПЦР определяли пороговые циклы амплификации (Ct) целевых генов белков SAT 1, SKA 2, и референсного гена белка GAPDH. Оценку экспрессии целевых генов проводили относительно референсного гена по разнице средних значений соответствующих пороговых циклов амплификации (Ct) как показатель ΔCt , равный (Ct целевой ген — Ct референсный ген). Медиану (Me), минимальное (мин), максимальное (макс) значения использовали для характеристики данных. Критерий Манна-Уитни использовали для определения достоверности различий между группами. Корреляцию анализировали с использованием метода Спирмена. Значения $p < 0,05$ определяли статистическую значимость различий показателей между группами.

Основные результаты. Из образцов слюны выделена РНК со следующими характеристиками: концентрация 12,9 (9,6/14,7) нг/мкл, отношение абсорбций 260 нм/280 нм 1,8-2,2, результаты экспрессии целевых генов белков SAT

1 и SKA 2 и референсного гена GAPDH положительные. Показатели ΔCt генов белков SAT 1 и SKA 2 в слюне кор-

релировали с соответствующими показателями в крови (таблица).

ТАБЛИЦА. ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ (ОЭГ) БЕЛКОВ SAT 1 И SKA 2 В КРОВИ И СЛЮНЕ ПАЦИЕНТОВ ГРУПП «СУИЦИД» И «РАССТРОЙСТВО АДАПТАЦИИ» (РА)

Группа пациентов	Биологический материал	ОЭГ SAT 1	Корреляция, R	ОЭГ SKA 2	Корреляция, R
Суицид	Слюна	-1,68 (-2,86/-0,72)*	0,98	1,89 (1,37/3,15) #	0,94
	Кровь	-1,28 (-2,84/0,04)**		1,71 (-0,04/2,01)##	
РА	Слюна	-0,21 (-1,26/0,79)*	0,96	1,23 (0,81/2,14) #	0,96
	Кровь	0,15 (-1,1/1,04)**		0,07 (-1,24/1,16)##	

Примечание — *,**,#, ## — различия значимы с уровнем значимости $p < 0,05$

Достоверные отличия наблюдались в значениях относительной экспрессии генов белков SAT 1 и SKA 2 в крови и слюне между группами «Суицид» и «Расстройство адаптации», характеризующиеся значимо большей экспрессией гена белка SAT 1 и значимо меньшей экспрессией гена белка SKA 2 в группе «Суицид» (таблица).

Выводы:

1. Белки SAT 1 и SKA 2 ассоциированы с суицидальным поведением, что в данном исследовании подтверждается отличием в экспрессии генов белков SAT 1 и SKA 2 в крови и слюне лиц, предпринявших попытку суицида, от значений соответствующих показателей в группе сравнения. Относительная экспрессия гена белка

SAT 1 (показатель ΔCt) в крови и слюне достоверно выше ($p < 0,05$) для лиц, входящих в группу «Суицид», в сравнении с группой «Расстройство адаптации», тогда как относительная экспрессия гена белка SKA 2 (показатель ΔCt) в крови и слюне достоверно ниже ($p < 0,05$) для лиц группы «Суицид» в сравнении с данным параметром у лиц группы «Расстройство адаптации».

2. Показатели ОЭГ белков SAT 1 и SKA 2 в слюне положительно коррелировали с соответствующими показателями в крови, поэтому применение слюны целесообразно в качестве биологического материала для оценки экспрессии генов белков SAT 1 и SKA 2, также учитывая неинвазивности процедуры получения данного биологического материала.

АРОЕ И ЛИКВОРНЫЕ БИОМАРКЕРЫ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Невзорова К.В., Федотова Е.Ю., Шпилюкова Ю.А., Проценко А.Р., Шабалина А.А., Иллариошкин С.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии» (ФГБНУ «НЦН»), Москва, Россия.

Введение. Болезнь Альцгеймера (БА) — хроническое нейродегенеративное заболевание, являющееся наиболее распространенной причиной деменции у пожилых людей. Дисбаланс между синтезом и клиренсом амилоида-бета ($A\beta$) в головном мозге является ключевым звеном в патогенезе заболевания и приводит к накоплению и агрегации токсичных форм $A\beta$ в виде внеклеточных бляшек. Аполипротеин Е, кодируемый геном АРОЕ, играет важную роль в транспорте $A\beta$. Среди трех аллельных вариантов гена ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) аллель $\epsilon 3$ наиболее широко представлен в популяции и считается нейтральным в отношении риска БА. Было доказано, что аллель $\epsilon 2$ является протективным фактором развития заболевания, а аллель $\epsilon 4$ — является фактором риска развития заболевания и более раннего начала клинических проявлений. Согласно данным литературы, гомозиготное носительство аллеля $\epsilon 4$ в 10-15 раз повышает риск БА, а гетерозиготное — в 3-4 раза для лиц в возрасте старше 65 лет.

Цель и задачи. Оценить связь между генотипом АРОЕ и показателями ликворных биомаркеров БА.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 54 пациента (32 женщины и 22 мужчины, средний возраст — $66,9 \pm 9,09$ лет): 30 из них с типичной (амнести-

ческой) БА и 24 с атипичными клиническими фенотипами (5 пациентов с диагнозом задней корковой атрофии, 9 пациентов с логопеническим вариантом первичной прогрессирующей афазии, 7 пациентов с клиническим фенотипом кортикобазального синдрома и 3 пациента соответствовали критериям лобного варианта БА). Всем пациентам была проведена люмбальная пункция с исследованием ликворных биомаркеров (амилоид-бета 1-42 и фосфорилированный тау-белок 181) для подтверждения диагноза БА. Также методом прямого автоматического секвенирования проанализированы 2 полиморфизма в 4 экзоне гена АРОЕ: rs429358 (Cys130Arg) и rs7412 (Arg176Cys), определяющих генотип состоящий из сочетания следующих возможных аллелей: изоформа $\epsilon 2$ (cys130, cys176), изоформа $\epsilon 3$ (cys130, arg176), изоформа $\epsilon 4$ (arg130, arg176).

Результаты. В соответствии с клиническими рекомендациями Международной рабочей группы (Dubois B. et al., 2021) на основании результатов исследования цереброспинальной жидкости выделены основные группы с вероятным (21 пациента) и возможным (10 пациентов) диагнозом БА, остальные пациенты были собраны в группу, где первичная патология БА не подтверждена (23 пациента). Частота гомо-

зиготного носительства аллеля $\epsilon 4$ в гене APOE у пациентов с вероятным диагнозом составила 9,5% (2 пациента), гетерозиготного — 61,9% (13 пациентов). В группе возможной БА частота гомозиготного носительства $\epsilon 4$ составила 10% (1 пациент), гетерозиготного — 30% (3 пациента). Частота носительства $\epsilon 4$ в группе с «неальцгеймеровской» патологией была ниже и составила 4,3% (1 пациент) для гомозиготного носительства и 34,7% (8 пациентов) для гетерозиготного.

По количественному показателю уровня A β 1-42 в ликворе было выявлено статистически значимое различие ($p = 0,027$) между группой пациентов с носительством аллеля $\epsilon 4$ (в гомо- и гетерозиготном состоянии) и пациентами, не являющимися носителем данного аллеля: меди-

на концентрации A β 1-42 для носителей $\epsilon 4$ составила 170 пг/мл, а для неносителей — 450 пг/мл.

Выводы. По результатам проведенного исследования выявлена более высокая частота встречаемости аллеля $\epsilon 4$ как в гомо-, так и в гетерозиготном состоянии у пациентов с подтвержденной патологией БА. Так же выявлено достоверно более низкий уровень A β 1-42 в ликворе у пациентов, являющихся носителями данного аллеля. Полученные нами результаты согласуются с данными мировой литературы, однако, имеют несколько более низкий процент встречаемости гомозиготного носительства $\epsilon 4$ в гене APOE, что, вероятно, может быть связано с небольшой выборкой пациентов и требует дальнейших исследований.

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА GSS С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ПСОРИАЗА: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Е.В. Ефанова^{1*}, Р.В. Саранюк², О.Ю. Бушуева³, А.В. Полоников³

¹ ОБУЗ Медвенская центральная районная больница, Курск

² ООО «Центр медицинских осмотров и профилактики», Курск

³ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск

*e-mail: pogozheva25@mail.ru

Цели. Глутатион играет важную роль в регуляции метаболических процессов в коже и защищает клетки окислительного стресса. Нарушения синтеза глутатиона (GSH) и связанный с ним окислительный стресс могут иметь патогенетическое значение для развития псориаза. Глутатионсинтаза (GSS) является вторым ферментом в реакциях биосинтеза GSH. Целью настоящего исследования был анализ ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) гена GSS с риском развития псориаза с учетом принадлежности.

Методы. В исследование было вовлечено 944 неродственных индивидов славянского происхождения (474 пациента с псориазом и 470 здоровых лиц). Выполнено генотипирование 5 функционально значимых SNP гена GSS на платформе MassArray Analyzer 4. Статистическую обработку данных проводили программой PLINK v1.9. Уровень

значимости ассоциаций оценивался посредством пермутаций и ассоциации считались значимыми при $P_{\text{perm}} < 0,05$.

Результаты. Установлено, что полиморфизм rs6088660 гена GSS ассоциирован с повышенным риском развития псориаза (OR=1,32 95%CI 1,02-1,71, $P_{\text{perm}}=0,037$) в общей группе. Установлены пол-специфические ассоциации полиморфных вариантов гена GSS с развитием дерматозом: rs2236270 ($P_{\text{perm}}=0,048$), rs7265992 ($P_{\text{perm}}=0,039$) и rs6088660 ($P_{\text{perm}}=0,05$) были ассоциированы с риском развития псориаза у женщин.

Заключение. Настоящее исследование впервые продемонстрировало, что полиморфные варианты гена GSS ассоциированы с предрасположенностью к псориазу, однако их влияние на риск развития болезни носят пол-специфический характер и требует дальнейшего изучения для выяснения природы выявленных ассоциаций.

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ FSHB 2BP DEL VAL79GLUFS И KITLG C80441T С СИНДРОМОМ ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ

Зыкова Г.С., Елисеева Л.В., Лянгасова О.В., Александрова А.А.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия.

Введение. Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) — это распространенное эндокринное мультифакторное заболевание, которое встречается в основном у женщин репродуктивного возраста и клинически проявляющееся в олиго- или ановуляции, морфологии поликистозных

яичников и гиперандрогении. Такое состояние является часто наблюдаемой причиной бесплодия, приводящее как к преждевременным родам, так и к абдоминальному висцеральному ожирению и гиперинсулинемии. Значительный вклад в развитие СПКЯ вносят генетические факторы.

Известно, что высокое соотношение ЛГ/ФСГ оказывает влияние на развитие синдрома, что может быть обусловлено полиморфизмами в генах β -субъединиц гонадотропинов *LHB* и *FSHB*. Среди генов-кандидатов также можно выделить ген *KITLG*, продукт которого является единственным лигандом рецептора KIT и активизирует соответствующий сигнальный путь. Нарушение передачи сигналов KIT приводит к множеству дефектов развития в гаметогенезе, а увеличение уровня экспрессии *KITLG* в яичниках может провоцировать увеличение овариального резерва и количества антральных фолликулов, что в свою очередь характерно для морфологии поликистозных яичников.

Цель и задачи. Целью настоящей работы было изучение ассоциации вариантов генов *FSHB* 2bp del Val79Glufs и *KITLG* C80441T с синдромом поликистозных яичников. Для реализации данной цели были поставлена задача изучить частоты генотипов по исследуемым вариантам генов в группе женщин с СПКЯ и в контрольной группе.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 86 женщин в возрасте от 22 до 40 лет, проходившие процедуру экстракорпорального оплодотворения в «Центре репродукции человека и ЭКО» в г. Ростове-на-До-

ну. Было сформировано 2 группы пациентов: с подтвержденным диагнозом СПКЯ ($n=50$) и контрольная ($n=36$). Контрольную группу составили женщины, участвующие в программах ЭКО / ИКСИ по причине непроходимости маточных труб или мужского фактора. Анализ полиморфных вариантов генов *KITLG* (C80441T) rs10506957 и *FSHB* 2bp del (Val79Glufs) rs5030646 проводили методом аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени.

Основные результаты. В результате проведенных исследований было установлено следующее. В контрольной группе распределение частот генотипов по гену *KITLG* C80441T составило: CC — 3 %, CT — 30 %, TT — 67 %, в группе пациентов с СПКЯ — CC — 4 %, CT — 22 %, TT — 74 %. Вариант гена *FSHB* 2bp del Val79Glufs не был обнаружен ни в одной из исследуемых групп.

Выводы. В проведенных нами исследованиях не было выявлено статистически значимой разницы в распределении генотипов между женщинами с СПКЯ и женщинами из контрольной группы ни по одному из исследуемых вариантов генов.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-15-00464.

ОСОБЕННОСТИ СВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА RS5443 ГЕНА GNB3 И ПОЛИМОРФИЗМА RS1801282 ГЕНА PPARG2 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА

Глинкина Т.В., Костюк С.А., Руденкова Т.В., Полуян О.С., Лямцева А.К., Штонда М.В., Акола Т.В.

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Введение. В настоящее время особый интерес вызывает изучение генетических факторов, ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и метаболическими нарушениями. G белки участвуют в передаче сигналов внутрь клеток. В ряде исследований показана ассоциация rs5443 гена белка GNB3 с артериальной гипертензией. У носителей аллеля T выявлена более выраженная вазоконстрикция в ответ на действие эндотелина, ангиотензина II и норадреналин, а также повышенная жесткость артериальной стенки, что предрасполагает к развитию сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с метаболическими нарушениями. Белок PPARG2 представляет собой транскрипционный фактор, регулирующий обмен жирных кислот, глюкозы, адипогенез. В научной литературе представлены данные об ассоциации rs1801282 гена белка PPARG2 с избыточной массой тела, инсулинорезистентностью, развитием атеросклероза, являющимися факторами риска сердечно-сосудистых осложнений. Как и для большинства полиморфизмов данные о связи rs5443 и rs1801282 с изучаемыми патологическими состояниями неоднозначны и определяются особенностями популяции, в которых проводились исследования.

Цель: оценить связь полиморфизма rs5443 гена белка GNB3 и полиморфизма rs1801282 гена белка PPARG2 с ри-

ском развития ишемической болезни сердца у пациентов с артериальной гипертензией и избыточной массой тела.

Материалы и методы. В основную группу вошли 107 пациентов в возрасте от 56 до 73 лет, 59 мужчин и 48 женщин, с артериальной гипертензией, избыточной массой тела и сопутствующей ишемической болезнью сердца (далее группа «ИБС»). Группу сравнения составили 120 пациентов в возрасте от 52 до 70 лет, 68 мужчин и 52 женщины с артериальной гипертензией, избыточной массой тела без сопутствующих сердечно-сосудистых осложнений. Всем пациентам было выполнено молекулярно-генетическое исследование по определению полиморфизма rs5443 гена белка GNB3 и полиморфизма rs1801282 гена белка PPARG2 с применением коммерческих наборов («Синтол», Россия).

Для сравнения частот аллелей и генотипов между различными группами использовали критерий χ^2 . Значения $p < 0,05$ определяли статистическую значимость различий показателей между группами. Об ассоциации аллелей или генотипов с риском ИБС судили по величине отношения шансов (ОШ).

Основные результаты. В результате сравнения частот аллельных вариантов по полиморфному маркеру rs5443 гена белка GNB3 в генотипах пациентов основной группы и группы сравнения выявлена ассоциация геноти-

па ТТ ($\chi^2=5,50$; $p=0,02$) с ИБС. У пациентов основной группы более чем в 2 раза чаще выявлялся генотип ТТ (ОШ=2,66).

Статистически значимых различий в частотах распределения аллелей и генотипов СС, СТ не установлено (таблица).

ТАБЛИЦА. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА RS5443 ГЕНА БЕЛКА GNB3 И ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА RS1801282 ГЕНА БЕЛКА PPARG2 У ПАЦИЕНТОВ С ИБС И В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ

Аллели, генотипы, n(%)	Группа «ИБС»	Группа сравнения	χ^2	p	Отношение шансов (ОШ)
	n=107	n=120			
Полиморфный маркер rs5443 гена белка GNB3					
Аллель С	123(57,5)	154(64,2)	2,13	0,15	0,85
Аллель Т	91(42,5)	86(35,8)			1,15
Генотип СС	35(32,7)	43(35,8)	0,25	0,62	0,87
Генотип СТ	53(49,5)	68(56,7)	1,16	0,28	0,75
Генотип ТТ	19(17,8)	9(7,5)	5,50	0,02	2,66
Полиморфный маркер rs1801282 гена белка PPARG2					
Аллель С	193(90,2)	204(85,0)	2,77	0,1	1,31
Аллель G	21(9,8)	36(15,0)			0,78
Генотип СС	88(82,2)	94(78,4)	0,54	0,46	1,28
Генотип СG	17(15,9)	16(13,3)	0,30	0,59	1,23
Генотип GG	2(1,9)	10(8,3)	4,72	0,03	0,21

При анализе распределения частот встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма rs1801282 гена белка PPARG2 у пациентов группы «ИБС» генотип GG встречался достоверно реже ($\chi^2=4,72$; $p=0,03$) и являлся протективным фактором, снижающим риск развития ИБС у пациентов основной группы (ОШ=0,21). Частоты встречаемости аллелей и генотипов СС, СG у пациентов с наличием ИБС и в группе сравнения достоверно не различались (таблица).

Заключение. Выявлена достоверная ассоциация риска развития ИБС с генами белков GNB3 и PPARG2, продукты экспрессии которых участвуют в патогенетических

механизмах сердечно-сосудистых осложнений. Установлено, что генотип ТТ по полиморфизму rs5443 гена белка GNB3 повышает риск развития ИБС, тогда как генотип GG по полиморфизму rs1801282 гена белка PPARG2 снижает риск ИБС у пациентов с артериальной гипертензией и избыточной массой тела. Представленные данные позволяют использовать определение полиморфизмов rs5443 гена белка GNB3 и rs1801282 гена белка PPARG2 в качестве дополнительного критерия при оценке индивидуального прогноза формирования ИБС у пациентов с артериальной гипертензией и избыточной массой тела.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГЕНОВ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В ГЕНЕЗЕ ЗАДЕРЖКИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА

Алсет Д.М., Сергеева А.Д., Покудина И.О., Бутенко Е.В., Шкурат Т.П.

ФГАОУВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия

Актуальность. Задержка роста плода (ЗРП) — это осложнение беременности, которое не позволяет эмбриону достичь своего генетически детерминированного потенциала роста и сопряжено с риском неблагоприятных исходов для плода. Аномальное развитие плаценты является преобладающим патологическим изменением, а также ведущей причиной развития ЗРП (Zhang et al., 2023). Развитие и поддержание структуры плаценты и клеточной функции зависят от иммунной системы матери, обеспечивающей иммунную толерантность к аллоантигенам плода. Цитокины являются важными регуляторами беременности и родов, они ответственны за толерантность или отторжение эмбриона. Аномальная экс-

прессия провоспалительных цитокинов во время беременности способствует преждевременным родам, преэклампсии, повторному выкидышу, ЗРП, в то время как противовоспалительные цитокины развивают иммунную толерантность матери к плоду (Munro et al., 2021; Yang et al., 2022).

Целью исследования было изучение наличия ассоциаций между полиморфными вариантами генов цитокинов C-589T (rs2243250) *IL4*, G-197A (rs2275913) *IL17A* и C-174G (rs1800795) *IL6* и ЗРП.

Материалы и методы. В работе были генотипированы образцы ДНК, полученные из периферической крови 22 женщин с установленным диагнозом ЗРП (средний воз-

раст 31 ($\pm 4,8$) год) и 37 женщин с нормально протекающей беременностью (контрольная группа, средний возраст 31 ($\pm 3,9$) год), проживающих в г. Ростов-на-Дону. Выделение ДНК проводили методом сорбционной экстракции с использованием реагентов «НК-сорбент» «Blood» (ООО НПФ «Литех», Россия). Полиморфные варианты G-197A гена IL17A и C-589T гена IL4 выявляли с помощью наборов реагентов «SNP-SHOT» и «SNP-экспресс-PB» (ООО НПФ «Литех», Россия) методом аллель-специфической RT-ПЦР на приборе «Applied Biosystems QuantStudio 5» («Life Technologies Holdings Pte. Ltd.», Сингапур). Мутации C-174G гена IL6 детектировали реагентами «SNP-экспресс-ЭФ» (ООО НПФ «Литех», Россия). Разделение полученных продуктов амплификации проводили в 3 % агарозном геле методом горизонтального электрофореза. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программы Statistica 6.0 и онлайн-калькуляторов, предоставляемых электронным ресурсом <https://medstatistic.ru/calculators.html>.

Результаты. Распределение частот генотипов в группе с ЗРП и контроле находилось в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга ($p > 0,05$). При сравнении частот аллелей и генотипов полиморфного варианта C-589T гена IL-4 в группе с ЗРП и контроле выявлена ассоциация полиморфизма C-589T гена IL-4 с риском развития ЗРП: дикая аллель С (OR=0,396; 95 % CI 0,182–0,862) достоверно снижает риск развития патологии, тогда как мутантная аллель Т (OR= 2,524; 95 % CI 1,160 — 5,492) и гомозиготный генотип Т/Т (OR=4,714; 95 % CI 1,218 — 18,245) повышают его. Анализ полученных результатов показал ассоциацию полиморфизма C-174G гена IL-6 с риском развития ЗРП:

дикая аллель С (OR=0,222; 95 % CI 0,091 — 0,542) обладает протекторным эффектом; мутантная аллель Т (OR= 4,5; 95 % CI 1,845–10,973) и гомозиготный генотип Т/Т (OR=3,646; 95 % CI 1,204–11,044) являются факторами риска. Статистически значимых различий в соотношении частот аллелей и генотипов по полиморфизму G-197A гена IL17A между опытной группой и контролем не обнаружено.

Выводы. Таким образом, установленные в исследовании данные, показали потенциальную функциональную значимость rs2243250 IL4 и rs2275913 IL17A в развитии ЗРП и необходимость изучения полиморфизмов генов цитокинов для возможного использования в диагностике, профилактике или лечении ранних патологий беременности и эмбрионального развития.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности, проект № FENW-2023-0018

Список литературы:

1. Zhang X. Y. et al. IL-27 deficiency inhibits proliferation and invasion of trophoblasts via the SFRP2/Wnt/ β -catenin pathway in fetal growth restriction // International Journal of Medical Sciences. — 2023. — V. 20, №. 3. — P. 392-405.
2. Munro S. K. et al. Cytokines and pregnancy: Potential regulation by histone deacetylases // Molecular Reproduction and Development. — 2021. — V. 88, №. 5. — P. 321-337.
3. Yang X. et al. The Update Immune-Regulatory Role of Pro-and Anti-Inflammatory Cytokines in Recurrent Pregnancy Losses // International Journal of Molecular Sciences. — 2022. — V. 24, №. 1. — P. 132.

ЭПИГЕНОМИКА РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА: МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК CD4+ И CD14+ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ОБОСТРЕНИИ И РЕМИССИИ

Киселев И.С.¹, Кулакова О.Г.¹, Кабилов М.Р.², Батурина О.А.², Фаворова О.О.¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России (РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России), Москва, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Центр коллективного пользования «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, ЦКП «Геномика»), Новосибирск, Россия

Введение. Рассеянный склероз (РС) — хроническое аутоиммунное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС), которое поражает преимущественно молодое трудоспособное население. Более чем в 85% случаев у больных наблюдается ремиттирующий РС (РРС), при котором периоды обострения, характеризующиеся нарастанием неврологического дефицита, сменяются периодами ремиссии со снижением или полным исчезновением неврологической симптоматики. Развитие обострений у больных РРС связано с появлением в любой области ЦНС новых очагов демиелинизации и/или с реактивацией возникших ранее очагов. Точное время начала обострения у больного РРС пока невозможно спрогнозировать, однако известно, что некоторые внешние факторы, такие как стресс, курение, инфекционные заболевания, уровень витамина D и др.,

могут повышать риск его возникновения. Установлено, что действие многих внешних факторов может быть опосредовано эпигенетическими механизмами регуляции экспрессии генов и, в первую очередь, метилированием ДНК. Ранее мы обнаружили, что профиль метилирования ДНК мононуклеарных клеток крови больных РРС изменяется с развитием обострения. Однако вклад этого эпигенетического механизма в регуляцию экспрессии генов в отдельных субпопуляциях иммунных клеток, опосредующих активность патологического процесса при РРС, до сих пор остается неясным.

Цель и задачи. Провести анализ полногеномных профилей метилирования ДНК CD4+ лимфоцитов и CD14+ моноцитов крови больных РРС на стадиях ремиссии и обострения.

Материалы и методы. В исследование включено шесть больных РС (три женщины и трое мужчин) в

стадии ремиссии, и восемь (шесть женщин и двое мужчин) — в стадии обострения. Уровни метилирования CpG-сайтов ДНК из CD4+ и CD14+ клеток крови определяли с использованием ДНК-микрочипов Infinium HumanMethylation450 BeadChip и анализировали с применением пакета ChAMP (v.3.14) и других средств среды программирования R.

Основные результаты. В CD4+ лимфоцитах и CD14+ моноцитах крови выявлено 743 и 113 номинально значимых ($p < 0.01$, величина различий в уровнях метилирования между сравниваемыми группами $\beta > 10\%$) дифференциально метилированных CpG-позиций (ДМП), соответственно. При иерархической кластеризации обнаруженный профиль дифференциального метилирования ДНК хорошо разделяет между собой больных PPC в обострении и ремиссии. В CD4+ клетках пациентов в обострении наблюдается тотальное гиперметилирование ДНК (98.5% ДМП гиперметилировано), тогда как в CD14+ клетках число гиперметилированных ДМП существенно меньше (77.9%). В обеих клеточных субпопуляциях большинство ДМП расположено в области известных генов (76.1-77.5% ДМП) и внутри или в непосредственной близости от CpG-островков (59.3-64.2% ДМП). Общими для CD4+ и CD14+ клеток оказались 25 ДМП-содержащих генов: *AGBL4*, *ATP8B4*, *BCAT1*, *BTNL2*, *C9orf171*, *CACNA1D*, *CDKN1A*, *DCHS2*, *FAM189A1*, *FAM18A*, *KALRN*, *KLHL21*, *MEIS1*, *NID2*, *NOM1*, *PCDNB2*, *RARRES2*, *RUNX1*, *SGCE*, *SLC26A10*, *TBCD*, *TDRD5*, *TNS1*, *ZNF350*, *ZNF423*.

Поиск в анализированных образцах протяженных участков генома с измененными уровнями метилирования входящих в их состав CpG-сайтов — дифференциально метилированных регионов (ДМР) — позволил выявить ДМР в CD4+ лимфоцитах больных; он был значимо гиперметилирован при обострении PPC ($pFDR = 0.03$, максимальная $\beta = 0.12$). Обнаруженный ДМР расположен

на хромосоме 20 в гене *GNAS* и охватывает как минимум 7 CpG-сайтов в пределах CpG-островка chr20:57463652-57467739 (hg19). В CD14+ моноцитах дифференциального метилирования данного региона не наблюдается. Локус генома, в котором расположен ДМР, является импринтированным и кодирует множество различных белок-кодирующих и белок-некодирующих транскриптов. Обнаружено, что изменение метилирования в области этого ДМР является одним из механизмов регуляции экспрессии G α -субъединицы G-белка [1].

Заключение. Впервые показано, что при обострении и ремиссии PPC наблюдается изменение профилей метилирования ДНК как CD4+, так и CD14+ клеток больных, причем в CD4+ лимфоцитах этот процесс носит гораздо более выраженный характер и сопровождается тотальным гиперметилированием обнаруженных ДМП. Полученные данные свидетельствуют о том, что эпигенетический механизм метилирования ДНК участвует в активации патологического процесса при обострении PPC. В CD4+ лимфоцитах гиперметилирование ДНК может быть вовлечено прежде всего в изменение функциональной активности G-белков. Мы надеемся, что некоторые из выявленных нами маркеров дифференциального метилирования ДНК могут быть использованы для предсказания обострений PPC у конкретных пациентов и их своевременного предотвращения.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России №121040600400-8.

Список литературы.

1. Liu J, Chen M, Deng C, Bourc'his D, Nealon JG, Erlichman B, Bestor TH, Weinstein LS. Identification of the control region for tissue-specific imprinting of the stimulatory G protein alpha-subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(15):5513-8. doi: 10.1073/pnas.0408262102.

ГЕНЫ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНОЙ СИСТЕМЫ В ФОРМИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Кочетова О.В.¹, Авзалетдинова Д.Ш.², Булгакова А.З.², Ларкина А.П.¹, Корытина Г.Ф.¹

¹ Институт биохимии и генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук; (ИБГ УФИЦ РАН), Уфа, Россия

² Башкирский государственный медицинский университет, (БГМУ) Уфа, Россия

Актуальность. Одной из причин сахарного диабета 2 типа (СД2) является наличие избыточной массы тела и ожирение. Сложный патогенез формирования пищевой зависимости, которая приводит к ожирению, включает основные нейромедиаторные системы (адренергическую, холинергическую, серотонинергическую), гормональных систем (андрогенной, эстрогенной, глюкокортикоидной). Исследование по анализу ассоциаций нарушенного пищевого поведения с риском развития СД2 актуальной проблемой.

Цель нашего исследования — явился анализ полиморфных вариантов генов, мускариночувствительных

(CHRM1 rs2067477, CHRM4 rs2067482, CHRM5 rs7162140), никотинчувствительных рецепторов: (CHRNA3 rs1051730, rs578776, CHRNA4 rs1044396, CHRNA5 rs16969968, CHRNA6 rs892413, CHRNA7 rs3826029, CHRNB4 rs17487223), дофаминергических рецепторов (DRD2 rs1800497, DRD1 rs265981, DRD5 rs10033951), серотониновых рецепторов (HTR1D rs623988, HTR1F rs56398417, HTR2A rs6313, HTR2C rs6318, HTR3A rs1062613, HTR4 rs8088140, HTR7 rs114969659), рецептор гистамина (HRH2 rs206747, HRH4 rs8088140), нейропептид Y: (NPY2R rs1047214, NPY rs16147, NPY5R rs4314240) и глутаматергических рецепторов (GRIN2B rs7301328, rs1805476), GRIK3 (rs534131),

GRIA1 (rs2195450) и GABRA2 (rs279845) у больных СД2, дифференцированных по наличию ожирения и в контрольной группе.

Материал и методы. Использовали образцы ДНК неродственных индивидов, татар — по этнической принадлежности, проживающих на территории Республики Башкортостан. Число обследованных здоровых индивидов составило СД2 с сопутствующим ожирением (N=954), группа пациентов с СД2 без ожирения (N=420), и контрольная группа лиц без любых эндокринологических заболеваний (N=900). Средний возраст — 53,4±3,6 г. Исследование одобрено комитетом по этике ИБГ УНЦ РАН. От всех участников получали информированное добровольное согласие на использование биологического материала в планируемых исследованиях.

Генотипирование. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием метода фенольно-хлороформной очистки. Полиморфные варианты генов CHRМ1 rs2067477, CHRМ4 rs2067482, CHRМ5 rs7162140, CHRNA3 rs1051730, rs578776, CHRNA4 rs1044396, CHRNA5 rs16969968, CHRNA6 rs892413, CHRNA7 rs3826029, CHRNB4 rs17487223, DRD2 rs1800497, DRD1 rs265981, DRD5 rs10033951, HTR1D rs623988, HTR1F rs56398417, HTR2A rs6313, HTR2C rs6318, HTR3A rs1062613, HTR4 rs8088140, HTR7 rs114969659, HRH2 rs206747, HRH4 rs8088140, NPY2R rs1047214, NPY rs16147, NPY5R rs4314240, GRIN2B rs7301328, rs1805476, GRIK3 rs534131, GRIA1 rs2195450 и GABRA2 rs279845 анализировали при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием коммерческих наборов с флуоресцентной детекцией (FLASH/RTAS) (<http://testgen.ru>, ООО "Тест-Ген", Россия) и прибора BioRad CFX96 TM ("Bio-Rad Laboratories", Inc, USA). Флуоресценцию "по конечной точке" и дискриминацию генотипов определяли по протоколу BioRad CFX96TM, используя программу CFX Manager TM Software.

Анализ ассоциации с использованием базового аллельного теста и расчета показателя отношения шансов OR для редкого аллеля каждого анализируемого локуса, статистическую значимость различий между группами по частотам аллелей и генотипов произведен с использованием пакетов прикладных программ SPSS Statistic 22 и PLINK v. 1.07. Вклад генотипов изучаемых локусов в вариабельность количественных признаков, характеризующих метаболические нарушения, определяли при помощи критерия Крускала–Уоллиса (при сравнении трех групп) или Манна–Уитни (в случае двух групп). Для расчетов использовали программу SPSS Statistic 22. Мультилокусный анализ ассоциаций сочетаний аллелей/генотипов осуществлялся с помощью программы APSampler 3.6.1 (<http://sourceforge.net/projects/apsampler/>).

Результаты. Статистически значимые результаты в аддитивной модели были получены для локусов генов: CHRNA3 rs578776 для пациентов с СД2 в целом (OR=3.06 (CI95% 1.46-6.41), P=0.000001), для индивидов с ожирением (OR=1.39 (CI95% 1.07-1.81), P=0.012), для пациентов СД2 без ожирения (OR=2.04 (CI95% 1.51-2.57), P=0.0001).

HTR3A rs1062613 для пациентов с СД2 в целом (OR=3.26 (CI95% 1.92-5.56), P=0.000002), для пациентов с СД2 и ожирением (OR=1.55 (CI95% 1.25-1.92), P=0.0001).

HTR2C rs6318 для пациентов с СД2 в целом (OR=1.99 (CI95% 1.55-2.98), P=0.0001), для пациентов с СД2 и ожирением (OR=1.47 (CI95% 1.13-1.91), P=0.002), для пациентов СД2 без ожирения (OR=1.78 (CI95% 1.34-2.36), P=0.00001), для индивидов с ожирением (OR=1.19 (CI95% 0.97-1.47), P=0.73), данные представлены для женщин. Среди мужчин ассоциация показана только для диабета в целом (OR=1.87 (CI95% 1.435-2.36), P=0.0001).

NPY2R rs1047214 для пациентов с СД2 в целом (OR=0.35 (CI95% 0.26-0.47), P=0.000008), для пациентов с СД2 и ожирением (OR=0.50 (CI95% 0.41-0.61), P=0.0001), для индивидов с ожирением (OR=0.69 (CI95% 0.59-0.81), P=0.0001).

AVPR1A rs11174811 для пациентов с СД2 в целом (OR=1.75 (CI95% 1.22-2.51), P=0.0000001), для пациентов с СД2 и ожирением (OR=1.61 (CI95% 1.28-2.01), P=0.00001), для пациентов СД2 без ожирения (OR=1.55 (CI95% 1.24-1.93), P=0.00001).

GHRL rs696217 для пациентов с СД2 в целом (OR=0.12 (CI95% 0.01-0.96), P=0.004), для пациентов с СД2 и ожирением (OR=0.68 (CI95% 0.52-0.89), P=0.001).

В результате проведения мультилокусного анализа ассоциаций определено семь сочетаний генотипов и аллелей, показавших статистическую значимость с СД2. Аллель С локуса NPY2R_rs1047214 входил в состав двух моделей пониженного риска СД2 и аллель Т входит в состав двух моделей повышенного риска. В двух моделях встречался локус HTR3A_rs1062613, в этом случае аллель С представлена в модели пониженного риска заболевания, аллель Т определялся в составе моделей повышенного риска ($P_{\text{cor_FDR}} = 1.241\text{e-}21$ и ($P_{\text{cor_FDR}} = 3.656\text{e-}11$). При индивидуальном анализе ассоциация аллель С также чаще встречался среди здоровых. Наиболее значимая ассоциация была выявлена для сочетания HTR2C_rs6318*G+NPY2R_rs1047214*C+AVPR1B_rs33911258*T (OR=0.23, $P_{\text{cor_FDR}} = 3.51\text{e-}22$).

Выводы. Таким образом, нами было исследовано 30 полиморфных маркера генов нейротрансмиттерной системы в группах пациентов СД2 дифференцированных по наличию ожирения. Выявлено, что маркерами риска развития СД2 и /или ожирения являются (с учетом поправки P (FDR)) следующие полиморфные маркеры:

Маркером развития СД2 — HTR3A rs1062613 аллель эффекта Т (OR=3.26, $P = 2 * 10^{-5}$), HTR2C rs6318 аллель эффекта С, как среди мужчин, так и среди женщин (OR=1.99, P=0.0001; OR=1.87, P=0.0001), NPY2R rs1047214 аллель эффекта Т (OR=1.7, $P = 8 * 10^{-6}$), AVPR1A rs11174811 аллель эффекта А (OR=1.75, $P = 1 * 10^{-7}$), GHRL rs696217 аллель эффекта G (OR=0.12, P=0.004).

Маркер СД2 без ожирения CHRNA3 rs578776 аллель эффекта Т (OR=2.04, P=0.0001).

Маркер СД2 с ожирением NPY2R rs1047214 аллель эффекта Т (OR=1.86, P=0.0001), AVPR1A rs11174811 аллель эффекта А (OR=1.61, $P = 1 * 10^{-4}$), GHRL rs696217 аллель эффекта G (OR=0.60, P=0.001).

Исследование финансировалось Российским научным фондом (№22-25-00010).

РОЛЬ ГАПЛОТИПА $\epsilon 4$ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА E В РИСКЕ РАЗВИТИЯ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ЭНДОМЕТРИЯ

Иванова Т.И., Хорохорина В.А., Ткаченко Б.Э., Мкртчян Л.С., Крикунова Л.И., Замулаева И.А.

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба (МРНЦ им. А.Ф. Цыба) — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

Заболеваемость гиперплазией эндометрия (ГЭ) составляет примерно 133 случая на 100 000 женщин в год во всём мире [1]. Некоторые случаи ГЭ остаются недиагностированными, т.к. диагноз ставится только среди женщин, у которых проводилась биопсия эндометрия. Чаще всего ГЭ не является злокачественной, но в ряде случаев может привести к раку эндометрия (РЭ)[2]. В настоящее время недостаточно данных о патогенезе (ГЭ). Известно, что нарушенный метаболизм липидов, в частности ожирение, гиперэстрогения сопровождаются интенсификацией оксидативного стресса и являются факторами риска возникновения как ГЭ, так и РЭ. Окислительно-восстановительный баланс поддерживается рядом белков, которые часто представлены в разных изоформах, обусловленных генетическим полиморфизмом и отличающихся друг от друга структурой и функцией. Полиморфизм $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ (rs429358, rs7412) гена аполипопротеина E (APOE) хорошо изучен. Белок APOE — один из основных липопротеинов плазмы, участвующий в липидном транспорте, передаче клеточных сигналов, поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза, сопряжён со многими патологическими состояниями, в частности с канцерогенезом. Наиболее распространён гаплотип $\epsilon 3$. Для аллеля $\epsilon 4$ показаны существенные различия в эффектах, обусловленных возрастом, полом и типом онкопатологии [3]. Отличие аллеля $\epsilon 4$ от $\epsilon 3$ обусловлено заменой референсного тимина (Т) на цитозин (С) (rs429358) в определённом положении нуклеотидной последовательности гена APOE, приводящей к аргинину вместо цистеина в положении 130 аминокислотной последовательности. Ранее нами продемонстрирована ассоциация аллеля $\epsilon 4$ с риском развития рака яичников [4]. Определение ассоциированных с канцерогенезом генотипов актуально для формирования групп ри-

ска и понимания механизмов развития гиперпластических процессов эндометрия.

Целью данной работы был анализ роли аллеля $\epsilon 4$ rs429358 APOE в риске развития ГЭ.

Материал и методы. Материалом являлась ДНК клеток периферической крови 74 первичных пациенток с диагнозом гиперплазия эндометрия (средний возраст \pm стандартное отклонение: $50,7 \pm 10,3$ лет), проходивших лечение в МРНЦ им. А.Ф. Цыба, и 309 практически здоровых женщин (средний возраст \pm стандартное отклонение: $52,8 \pm 8,2$ лет). Все женщины перед забором крови подписали информированное согласие на проведение исследований. Генотипирование APOE проводили с помощью полимеразной цепной реакции с последующей обработкой ампликонов рестриктазой Cfo1 (Promega, Madison, USA) и определением длин фрагментов рестрикции (ПЦР/ПДРФ), как было описано нами ранее [5]. Оценивались частоты генотипов и аллелей $\epsilon 4$ (генотипы Т/Т, Т/С и С/С; аллели Т и С) APOE. Статистический анализ проводили стандартными методами с помощью пакета программ GraphPad Prism 8.0.1. При сравнении частот генотипов и аллелей применялся точный двусторонний критерий Фишера. Вклад генотипов в заболеваемость определялся с помощью показателя "odd ratio" (OR — отношение шансов).

Основные результаты. Частоты генотипов в обеих группах исследования соответствуют равновесному распределению Харди-Вайнберга, $p > 0,05$. Среди больных ГЭ женщин частота гетерозиготных генотипов Т/С (rs 429358 APOE) выше в два раза по сравнению с группой здоровых женщин (31% и 16% соответственно) (Таблица 1). Носители гомозиготных генотипов С/С не выявлено ни у здоровых, ни у больных женщин. У последних это могло быть обусловлено малочисленностью выборки.

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ RS429358 APOE У БОЛЬНЫХ ГИПЕРПЛАЗИЕЙ ЭНДОМЕТРИЯ И ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН

Статус здоровья	Число генотипов (частота, %)			P OR 95% ДИ	Число аллелей (частота, %)		P OR 95% ДИ
	Т/Т	Т/С	С/С		Т	С	
ГЭ	51 (69)	23(31)	0	0,005 2,39 1,36-4,31	125 (85)	23 (15)	0,007 2,14 1,27-3,60
Здоровые	260 (84)	49 (16)	0		569 (92)	49 (8)	

Примечание: OR — отношение шансов, P — уровень значимости, ДИ — доверительный интервал.

Показано, что минорный аллель С APOE значимо ассоциирован с ГЭ ($p=0,007$; OR=2,14; 95% ДИ 1,27-3,60), частота встречаемости вариантных генотипов (Т/С) у пациенток с диагнозом ГЭ, значимо увеличена ($p=0,005$; OR=2,39).

Заключение. Гаплотип $\epsilon 4$ (rs429358) APOE ассоциирован с ГЭ и представляет интерес для более глубокого анализа закономерностей развития гиперпластических процессов эндометрия.

1. Reed S.D., Newton K.M., Clinton W.L. et al. Incidence of endometrial hyperplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200: 678. e1-678.e6.

2. Гиперплазия эндометрия. Клинические рекомендации Минздрава России. 2021. Российское общество акушеров-гинекологов.

3. Kulminski A.M., Arbeev K.G., Culminskaya I., et al. Age, gender, and cancer but not neurodegenerative and cardiovascular diseases strongly modulate systemic effect of the apolipoprotein E4 allele on lifespan // *PLoS genetics*. — 2014. — Vol. 10. — e1004141, P.1-12.

4. Иванова Т.И., Сыченкова Н.И., Хорохорина В.А., Рябченко Н.И., Иванов С.А., Крикунова Л.И. Ассоциация аллеля E4 (rs429358) гена аполипопротеина E (APOE) с серозной аденокарциномой яичников. *Вопросы онкологии*. 2017. Т.63. №4. С.627-631.

5. Ivanova T.I., Krikunova L.I., Ryabchenko N.I., Mkrtchyan L.S., Khorokhorina V.A., Salnikova L.E. Association of the apolipoprotein E 2 allele with concurrent occurrence of endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2015, Volume 2015, Article ID 593658.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *ANKK1*, *LTA* И *TNF-α* У ПАЦИЕНТОВ С ПАРАНОИДНОЙ ШИЗОФРЕНИЕЙ ИЗ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Вольчик В.В.¹, Машкина Е.В.¹, Солдаткин В.А.²

¹ Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского, Ростов-на-Дону, Россия

² Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

Шизофрения — тяжелое психическое расстройство, характеризующееся нарушением мыслительных процессов, восприятия, воли, эмоциональной реакции, когнитивных процессов и социальных взаимодействий. Благодаря многочисленным исследованиям подтверждается гипотеза о том, что нарушение регуляции дофамина играет важную роль в развитии шизофрении (Howes et al., 2022). Белок 1, содержащий анкириновый повтор и киназный домен (*ANKK1*) участвует в метаболизме дофамина в головном мозге (Gluskin et al., 2016). Имеются данные о том, что полиморфный вариант rs1800497 гена *ANKK1* модулирует плотность экспрессии рецепторов дофамина DRD2 посредством регуляции фактора транскрипции NF-κB (Ghosh et al., 2013). На данный момент проводится много исследований в области изучения влияния иммунной системы на развитие шизофрении (Birnbau et al., 2020). Фактор некроза опухоли альфа (*TNF-α*) и Лимфотоксин-альфа (*LTA*) являются провоспалительными цитокинами — важнейшими медиаторами взаимодействия между иммунной системой и мозгом (Dantzer, 2018). Полиморфные варианты $-308G>A$ гена *TNF-α* и rs909253 гена *LTA* приводят к увеличению экспрессии данных генов (Lu et al., 2012; Wei et al., 2016).

Целью работы было исследовать сочетанный вклад rs1800497 гена *ANKK1*, $-308G>A$ гена *TNF-α* и rs909253 гена *LTA* в формирование риска развития шизофрении у людей из Ростовской области.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из клеток крови термокоагуляционным методом. Группа популяционного контроля содержала 69 образцов (36 женщин и 33 мужчины), а в группу с заболеванием включено 94 образца ДНК лиц с шизофренией (49 женщин и 45 мужчин).

Генотипирование по исследуемым SNP проводили с помощью следующих методов: ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов (rs1800497 гена *ANKK1*);

аллель-специфической ПЦР ($-308G>A$ гена *TNF-α*) и ПЦР с последующей рестрикцией (rs909253 гена *LTA*). Статистическая обработка была осуществлена с использованием программ InStat и Multifactor Dimensionality Reduction 3.0.2 (MDR).

В ходе работы отдельно для каждого полиморфизма (rs1800497 гена *ANKK1*, $-308G>A$ гена *TNF-α*, rs909253 гена *LTA*) статистически значимых различий как в частотах аллелей, так и в частотах генотипов между контрольной группой и группой людей больных шизофренией получено не было. Однако взаимодействие исследуемых локусов статистически значимо для развития шизофрении ($\chi^2 = 7,06$; $p = 0,008$; OR: 2,97 (1,30–6,79), точность модели: 10/10). Помимо этого, характер взаимодействия трёх исследуемых локусов оказался разным для мужчин и для женщин. Для лиц мужского пола больных шизофренией был выявлен эффект синергизма между полиморфными локусами генов *ANKK1* и *TNF-α*. У женщин между данными локусами наблюдается эффект антагонизма. Можно выдвинуть предположение, что данный результат связан с нейропротективным действием эстрогенов (Kulkarni et al., 2019).

Таким образом, судя по результатам нашей работы, мы предполагаем, что дофаминовый и воспалительный компоненты оказывают сочетанный вклад в развитие шизофрении. Но так как наблюдается разный характер взаимодействия трёх исследуемых локусов у мужчин и у женщин, требуются дополнительные исследования с учетом полового компонента.

Список использованных источников

1. Birnbaum R., Weinberger D. R. A genetics perspective on the role of the (neuro) immune system in schizophrenia // *Schizophrenia research*. — 2020. — V. 217. — P. 105-113.

2. Dantzer R. Neuroimmune interactions: from the brain to the immune system and vice versa // *Physiological reviews*. — 2018. — V. 98. — №. 1. — P. 477-504.

3. Ghosh J., Pradhan S., Mittal B. Identification of a novel *ANKK1* and other dopaminergic (DRD2 and DBH) gene variants in migraine susceptibility // *Neuromolecular medicine*. — 2013. — V. 15, №. 1. — P. 61-73.

4. Gluskin B. S., Mickey B. J. Genetic variation and dopamine D2 receptor availability: a systematic review and meta-analysis of human in vivo molecular imaging studies // *Translational psychiatry*. — 2016. — V. 6. — №. 3. — P. e747-e747.

5. Howes O. D., Shatalina E. Integrating the neurodevelopmental and dopamine hypotheses of schizophrenia and the role of cortical excitation-inhibition

balance // *Biological psychiatry*. — 2022.

6. Kulkarni J., Butler S., Riecher-Rössler A. Estrogens and SERMS as adjunctive treatments for schizophrenia // *Frontiers in neuroendocrinology*. — 2019. — V. 53. — P. 100743.

7. Lu R. et al. A functional polymorphism of lymphotoxin-alpha (*LTA*) gene rs909253 is associated with gastric cancer risk in an Asian population // *Cancer Epidemiology*. — 2012. — V. 36, №. 6. — P. e380-e386.

8. Wei X. M. et al. Tumor necrosis factor- α G-308A (rs1800629) polymorphism and aggressive periodontitis susceptibility: a meta-analysis of 16 case-control studies // *Scientific reports*. — 2016. — V. 6, №. 1. — P. 19099.

АНАЛИЗ АССОЦИИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВАРИАНТА NOS3 –786 T>C ГЕНА NO СИНТАЗЫ 3 С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К РАЗВИТИЮ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

Перевезенцев О.А., Пименова В.В., Бурцев Д.В.

Государственное автономное учреждение Областной консультативно-диагностический центр, Ростов-на-Дону, Россия,

Актуальность темы. Одной из наиболее проблемных форм сердечно-сосудистой патологии в современной медицине является проблема патологических состояний, связанных с повышенным артериальным давлением (артериальной гипертензией). Различают первичную, или эссенциальную артериальную гипертензию (ЭАГ), и ряд вторичных симптоматических гипертензий, связанных с определёнными патологическими состояниями. С точки зрения терапевтической практики одной из актуальных типов гипертензий является ЭАГ, ассоциированная с атерогенным поражением сосудов и повышением их резистивных свойств. Как показано исследователями, как ЭАГ, так и атеросклероз, являются сложно наследуемым мультифакториальным заболеванием, в этиопатогенезе которых играют роль как наследственные, так и приобретённые факторы, причём одну из ключевых ролей в этиопатогенезе данных патологических состояний играет фермент синтаза оксида азота 3. Одним из генетических вариантов гена NO синтазы 3, для которого показана ассоциация с атерогенной ЭАГ, является вариант NOS3 –786 T>C. Так как исследования касательно данного генетического варианта на разных этнических популяциях показывали противоречивые результаты, нам показалось интересным изучить его ассоциацию с ЭАГ, ассоциированной с атеросклерозом, у пациентов Ростовской области, представляющих южно-русскую популяцию.

Цель работы. Целью нашей работы являлось изучение вклада определённых генотипов генетического варианта NOS3 –786 T>C гена NO синтазы 3 в этиопатогенез атерогенной ЭАГ.

Материалы и методы исследования. Был проведён молекулярно-генетический анализ 86 пациентов в возрасте от 45 до 70 лет с признаками артериальной ги-

пертензии, которая сочеталась с УЗИ признаками атеросклероза крупных сосудов, и 70 пациентом контрольной группы. Молекулярно-генетический анализ генотипов по генетическому варианту NOS3 –786 T>C проводился с использованием образцов полногеномной ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови набором Проба-Рapid генетика методом ПЦР в реальном времени с использованием набора Кардиогенетика гипертензия на амплификаторе ДТ-96. После прохождения ПЦР анализировались кривые плавления фрагментов ДНК с использованием анализа флуоресценции красителей FAM и HEX с автоматическим расчетом генотипа по варианту NOS3 –786 T>C (TT, TC, CC). Статистические расчёты были выполнены с помощью компьютерной программы STATISTICA 6.0.

Результаты. Проведённый нами анализ частоты генотипа CC генетического варианта NOS3 –786 T>C в исследуемой выборке пациентов с атерогенной ЭАГ и в контрольной выборке выявил достоверную ассоциацию данного генотипа с данным патологическим состоянием (OR=4.52, CI:3.02-7.3, P<0.0001). Анализ частоты встречаемости аллеля C по сравнению с аллелем T также показал ассоциацию с развитием ЭАГ, ассоциированной с атеросклерозом (OR=3.4, CI:1.83-4.5, P<0.0001).

Выводы. Из наших результатов следует, что в популяции Ростовской области генетический вариант NOS3 –786 T>C гена NO синтазы 3 ассоциирован с атерогенной ЭАГ, причём ключевую роль играет рискованный генотип CC данного варианта. Таким образом, ген синтазы оксида азота играет ключевую роль в этиопатогенезе данного патологического состояния, а молекулярно-генетический анализ NOS3 –786 T>C и может использоваться для уточнения этиопатогенеза ЭАГ.

АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПАНЕЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВАЗОВАГАЛЬНЫХ ОБМОРОКОВ

Матвеева Н.А., Титов Б.В., Базылева Е.А., Певзнер А.В., Фаворова О.О.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова» Минздрава России (ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России), Москва, Россия

Введение. Синкопальное состояние, или обморок, представляет собой преходящую потерю сознания из-за гипоперфузии головного мозга и характеризуется внезапным началом и полным спонтанным восстановлением. Среди довольно гетерогенной группы синкопальных состояний наиболее распространены вазовагальные обмороки (ВВО), существенно снижающие качество жизни из-за возможности рецидивов, травматизации и психосоциальных ограничений. ВВО относятся к мультифакториальным заболеваниям. Хотя причины развития ВВО до конца не ясны, не вызывает сомнения, что важная роль среди них принадлежит наследственной предрасположенности.

Цель и задачи. Поиск ассоциированных с ВВО однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNPs) генов и их биаллельных сочетаний, а также оценка возможности их использования для создания панели генетических маркеров, обеспечивающей эффективную диагностику ВВО.

Материалы и методы. В исследование генетической предрасположенности к ВВО методом «случай — контроль» было включено 175 неродственных больных ВВО (средний возраст \pm стандартное отклонение 35.89 ± 15.7 лет) из числа пациентов ФГБУ «НМИЦК им. акад. Е. И. Чазова» Минздрава России. Контрольная группа состояла из 200 индивидов (средний возраст 36.7 ± 13.7 лет) без обмороков, признаков органического поражения миокарда, а также других соматических или неврологических заболеваний в анамнезе. Диагноз ВВО был поставлен на основании комплексного исследования, включающего анализ клинических данных и результаты инструментального обследования. Во всех случаях были исключены иные причины приступов потери сознания. От всех индивидов, принимавших участие в исследовании, было получено информированное согласие.

Геномную ДНК из периферической крови выделяли с использованием коммерческого набора QIAamp DNA

Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия). Геномное типирование SNPs проводили методом ПЦП с детекцией в режиме реального времени с применением коммерческих наборов TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems) по инструкциям производителя на приборе StepOnePlus™.

Для выявления аллелей, генотипов и их биаллельных сочетаний, носительство которых ассоциировано с ВВО, использовали ПО APSampler. Значения ОШ, его 95%-ного ДИ, r_f по критерию Фишера и r_{perm} при пермутационном тесте определяли с использованием инструментов, входящих в состав этого ПО. Значимыми считали результаты при r_f менее 0.05 и 95%-ном ДИ, не пересекающем 1. Наличие эпистатического (нелинейного) взаимодействия между компонентами сочетаний оценивал с помощью точного трехфакторного теста, подобного критерию Фишера, по значениям r_{FLINT} , фактора синергии (ФС) и его 95%-ного ДИ, также включенных в ПО APSampler.

Основные результаты. Мы проанализировали ассоциацию с ВВО SNPs генов-кандидатов rs1048101 в гене *ADRA1A*, rs1801253 в гене *ADRB1*, rs6295 в гене *HTR1A*, rs5751876 в гене *ADORA2A*, rs4680 в гене *COMT* и rs2070744 в гене *NOS3*, продукты которых участвуют в патогенезе заболевания, а также четырех SNPs (rs12465214, rs12621296, rs17582219, rs1344706) в области 2q32.1, ассоциированной, по данным полногеномного поиска ассоциаций, с обмороками и коллапсом (МКБ-10, код R55). Нами было выявлено 5 одиночных и 6 биаллельных генетических вариантов, предрасполагающих к развитию ВВО; из них 6 выдерживали пермутационный тест (Таблица). Два предрасполагающих биаллельных сочетания характеризовались эпистатическим взаимодействием между вариантами. Это сочетания *ADRA1A**G/G + rs12465214*A ($r_{FLINT}=0.01$; ФС (95% ДИ)=3.52 (1.42 — 8.74)) и *COMT**G + *NOS3**T ($r_{FLINT}=0.043$; ФС (95% ДИ)=5.42 (1.16 — 25.4)).

ТАБЛИЦА. ВЫЯВЛЕННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ВВО

Аллели / генотипы	175 больных ВВО и 200 контролей	
	Частота носительства, случай / контроль	Величина r_f (r_{perm}) [ОШ (95% ДИ)]
Носительство отдельных аллелей/генотипов		
<i>COMT</i> *G (G/G + A/G)	137 (0.78) / 128 (0.64)	0.0015 (0.018) [2.04 (1.29 — 3.24)]
<i>ADRA1A</i> *G/G	110 (0.63) / 98 (0.49)	0.0041 (0.047) [1.78(1.18 — 2.69)]
<i>ADORA2A</i> *C/C	74 (0.42) / 58 (0.29)	0.0056 [1.78 (1.16 — 2.72)]
<i>ADRB1</i> *G (G/G + C/G)	122 (0.69) / 114 (0.57)	0.009 [1.70 (1.11 — 2.61)]
rs12621296*G/G	59 (0.34) / 44 (0.22)	0.0078 [1.80 (1.14 — 2.85)]

Носительство биаллельных сочетаний аллелей и генотипов		
COMT*G + ADORA2A*C/C	58 (0.33) / 30 (0.15)	0.000032 (0.00041) [2.78 (1.69 — 4.59)]
COMT*G + rs12465214*A	91 (0.52) / 64 (0.32)	0.000051 (0.00066) [2.33 (1.53 — 3.54)]
ADORA2A*G/G + rs12465214*A	86 (0.48) / 61 (0.31)	0.0002 (0.0025) [2.18 (1.43 — 3.32)]
COMT*G + NOS3*T	130 (0.73) / 113 (0.56)	0.00031 (0.004) [2.18 (1.40 — 3.37)]
rs12621296*G/G + rs12465214*A	52 (0.30) / 32 (0.16)	0.0011 [2.22 (1.35 — 3.65)]
rs12621296*G/G + rs1344706*A	51 (0.29) / 31 (0.15)	0.0011 [2.24 (1.35 — 3.71)]

Мы провели оценку прогностической эффективности выявленных генетических факторов риска по площади под кривой (AUC, Area Under Curve) методом логистической регрессии. Рассматриваемые генетические факторы риска развития ВБОУ оказались слабыми классификаторами: ни для одиночных SNPs, ни для биаллельных сочетаний значение AUC не достигало 0.60. В композитную модель каждый из факторов риска был включен только один раз: либо в качестве одиночного маркера, либо в составе сочетания. Для композитной модели достигается удовлетворительная прогностическая эффективность (AUC=0.70).

Заключение. Таким образом, впервые в одной и той же выборке выявлен вклад в развитие ВБОУ SNPs в области пяти генов, участвующих в патогенезе заболевания, и трех

SNPs в области 2q32.1. Наши данные об ассоциации с ВБОУ SNPs в области 2q32.1 находятся в хорошем соответствии с результатами, полученными методом полногеномного поиска ассоциаций для более широкой группы заболеваний — обмороки и коллапс, однако приводят к предположению о неидентичном вкладе генов, локализованных в этой области, в развитие различных типов синкопе. В целом, полученные данные свидетельствуют, что развитие ВБОУ, несомненно, имеет генетическую основу и в большинстве случаев определяется небольшим вкладом полиморфных вариантов многих генов, однако предсказательная сила их совместного вклада невелика. Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России (№ 121031300196-1).

ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗЫ, ИХ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И БРОНХИАЛЬНАЯ АСТМА У ДЕТЕЙ

Игнатиади Ю.В.¹, Машкина Е.В.¹, Лебеденко А.А.², Семерник О.Е.²

¹ Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

² Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. По результатам эпидемиологических исследований показано, что в Российской Федерации бронхиальной астмой болеют 10-15% детей. С каждым годом численность больных увеличивается (Жмуров и др., 2020). Защиту от аллергенов в организме выполняют, в том числе и глутатионтрансферазы — ферменты системы детоксикации (Книжникова и др., 2020). Ген глутатионтрансферазы P1 расположен в локусе 11q13, для которого показано сцепление с атопией и экспрессия в легочной ткани. Полиморфизм *Ala114Val* (rs1138272 c.341C>T GRCh38: Chr11:67586108) и *Ile105Val* (rs1695 c.313A>G GRCh38: Chr11:67585218) гена *GSTP1* могут оказывать влияние на функциональную активность фермента и на развитие заболевания.

Цель. Целью настоящего исследования было выявление взаимосвязи аллельных вариантов гена *GSTP1* с изменением риска развития бронхиальной астмы у детей.

Материал и методы. При проведении исследования использовали образцы ДНК, выделенные из крови 99 детей (44 — больных бронхиальной астмой, 55 — здоровых). Исследование аллельных вариантов гена *GSTP1* проведено методом аллель-специфичной ПЦР. Анализ межгенных взаимодействий осуществлен при помощи метода уменьшения многофакторной размерности (MDR). Анализ гапло-

типов проведен с помощью программы «SNP stats».

Основные результаты. В обеих исследуемых группах преобладали гомозиготы по аллели *Ala114* по полиморфизму *Ala114Val* гена *GSTP1*. В группе детей, больных бронхиальной астмой, генотип *Ala/Ala* составляет 93,2%, в контрольной группе — 63,6%. Частота аллели *114Val* среди детей, больных бронхиальной астмой, составила 0,03, что в 6 раз меньше по сравнению с контрольной группой. В группе детей, больных бронхиальной астмой, преобладают гомозиготы по аллели *Ile105* полиморфизма *Ile105Val*, частота данного генотипа составляет 57%. В контрольной группе преобладают гетерозиготы *Ile/Val* (49%). Частота аллели *105Val* составила в контроле 0,4; среди детей с бронхиальной астмой — 0,24. В результате проведенного исследования выявлены статистически значимые различия в распределении частот генотипов и аллелей гена по полиморфизмам *Ala114Val* и *Ile105Val* между здоровыми и больными бронхиальной астмой детьми. Повышенный риск развития заболевания характерен для гомозигот по аллели *114Ala* (OR = 7.8 95% CI 2.1 — 28.5) и гомозигот по аллели *105Ile* (OR = 2.4 95% CI 1.04 — 5.3). Гетерозиготы по полиморфизму *Ala114Val* имеют пониженный риск развития бронхиальной астмы (OR = 0.1 95% CI 0.04 — 0.5).

Геплотип *Ile105-Ala114*, статистически значимо чаще регистрируемый среди детей больных бронхиальной астмой, ассоциирован с повышением риска развития данного заболевания (OR = 3,12 95% CI 1,31-7,43).

Глутатион-S-трансфераза P1 с валином в 105 положении белка имеет повышенную каталитическую эффективность по отношению к полициклическим ароматическим углеводородным диоловым эпоксидам, содержащимся в продуктах сигаретного дыма и других полиароматических соединениях (Fryer A.A. et al., 2002). В случае полиморфизма *Ala114Val* эффект изменения ферментативной активности *GSTP1* изучен не достаточно (Dastjerdi et al., 2017). Данные литературы об ассоциации исследуемых полиморфизмов с развитием заболеваний дыхательных путей противоречивы. По некоторым данным установлено, что лица с генотипом *Ile/Ile* гена *GSTP1* более восприимчивы к воздействию табачного дыма в раннем возрасте (Dai et al., 2021). В районах с высоким загрязнением воздуха повышенный риск развития астмы имеют дети с генотипом *Ile/Ile* (Lee Y. et al., 2004).

Выводы. Полиморфизм гена *GSTP1* может оказывать влияние на риск развития бронхиальной астмы у детей.

Список использованной литературы:

1. Dai X., Perret J. L., Dharmage S. C. Interaction of

glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genes with early life tobacco smoke exposure on lung function in adolescents // CHEST. 14.01.2021. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32943407/>. (Дата обращения: 25.02.2023).

2. Dastjerdi A.H., Behboudi H., Kianmehr Z. Association of glutathione S-transferase polymorphisms with the severity of mustard lung // BiolImpacts. 2017. No 7. p. 255-261.

3. Fryer A. A., Bianco A., Hepple M. Polymorphism at the glutathione S-transferase *GSTP1* locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma // Am J Respir Crit Care Med. 2002. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10806136/>. (Дата обращения: 18.02.2023).

4. Lee, Y.-L.; Lin, Y.-C.; Lee, Y.-C.; Wang, J.-Y.; Hsiue, T.-R.; Guo, Y.L. Glutathione S-transferase P1 gene polymorphism and air pollution as interactive risk factors for childhood asthma // Clin. Exp. Allergy. 2004. No 34. p. 1707–1713.

5. Жмуров Д.В., Парфентева М.А., Семенова Ю.В.// Бронхиальная астма // Colloquium-journal. 2020; 15-25.

6. Книжникова Е.В., Евсеева Г.П., Наговицына Е.Б. Роль генов биотрансформации ксенобиотиков семейства глутатион-S-трансфераз (GSTs) в формировании предрасположенности к заболеваниям бронхолегочной системы // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2020; 75; 115-124.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *SIRT1* И ПАПИЛОМАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ

Машкина Е.В., Вольчик В.В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Актуальность. Рак шейки матки занимает 4-е место по частоте возникновения среди женщин в мире. Более 95% случаев рака шейки матки вызывается вирусом папилломы человека. Жизненный цикл вируса при ВПЧ-инфекции определяется влиянием вирусных белков на внутриклеточные процессы, прежде всего деление и дифференцировку клеток, активность факторов иммунной и репарационной систем. Генетический фон пациента вносит определенный вклад в развитие инфекционного процесса и может быть связан с различными его исходами. Длительная персистенция вируса сопровождается повышением вирусной нагрузки. Международное агентство по изучению рака зафиксировало, что высокая вирусная нагрузка является фактором риска развития рака шейки матки.

Сиртуин 1 (*SIRT1*) — деацетилаза, активность которой влияет на экспрессию генов, деление клеток, репарацию ДНК. *SIRT1* участвует в регуляции активности p53, апоптоза, воспалительных реакций, реакции старения. При ВПЧ-инфекции под влиянием онкобелка E7 в клетках человека увеличивается уровень белка *SIRT1*. В то же время сам *SIRT1* в инфицированных клетках инициирует сборку мультибелкового репликационного комплекса и обеспечивает точность репликации вирусной ДНК. В результате полиморфизма rs7069102 происходит замена цитозина на гуанин в четвертом интроне гена *SIRT1*. Показано, что HPV16+ раковые клетки, экспрессирующие онкобелки E6 и E7, характеризуются интеграцией вирусной ДНК в 13 генов человека, в том числе в интрон 4 гена *SIRT1* (Gu et al., 2022), а также повышением

уровня белка *SIRT1* (Allison, Jiang, Milner, 2009; Langsfeld, Bodily, Laimins, 2015). Можно предположить, что полиморфизм в интроне 4 гена *SIRT1* связан с более эффективной репликацией вируса папилломы человека в клетках эпителия.

Целью работы было изучить ассоциацию полиморфизма rs7069102 гена *SIRT1* с риском формирования клинически значимой вирусной нагрузки при ВПЧ-инфекции.

Материал и методы. Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из эпителиальных клеток урогенитального тракта женщин. Среди них — 124 женщины, инфицированные ВПЧ (с вирусной нагрузкой более 3lg (ВПЧ на 100 тысяч клеток)) и 121 — с отсутствием вируса. Все женщины, включенные в исследование, были старше 30 лет.

Тотальную ДНК выделяли согласно протоколу набора реагентов ДНК-сорб-АМ (НекстБио, Россия). Для количественной оценки ДНК ВПЧ высокого риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типы) в биологическом материале использовали тест-систему «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL». (ИнтерЛабСервис, Россия). Полиморфизм rs7069102 гена *SIRT1* анализировали методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческой тест-системы (Синтол, Россия).

Результаты. Частота минорной аллели С rs7069102 гена *SIRT1* в контрольной группе составила 0,29; в группе инфицированных ВПЧ женщин — 0,31. По данным проекта «1000 Genomes» частота данного варианта гена среди европеоидов равна 0,33. Статистически значимой разницы в частотах аллелей между исследуемыми нами группами

женщин не выявлено. В обеих группах женщин преобладают гомозиготы GG rs7069102 гена *SIRT1*: 47,1% в контрольной группе и 50,8% в группе женщин, инфицированных ВПЧ. Среди женщин с клинически значимой концентрацией ДНК вируса папилломы человека доля гомозигот CC составила 13,7%, тогда как в контрольной группе — 5,8%. Данный генотип ассоциирован с повышением риска формирования высокой вирусной нагрузки при ВПЧ-инфекции (OR = 2.59). Различия в частотах генотипов по rs7069102 гена *SIRT1* между двумя группами женщин статистически значимы ($p = 0,047$).

Выводы. У женщин старше 30 лет, инфицированных вирусом папилломы человека, генотип CC по rs7069102 гена *SIRT1* ассоциирован с риском увеличения вирусной нагрузки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках го-

сударственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018

Список использованных источников:

1. Gu W., Bhangale A., Heft Neal M., et al. Analysis of Human Papilloma Virus Content and Integration in Mucoepidermoid Carcinoma // *Viruses*. — 2022. — V. 14. N 11. — P. 2353.

2. Allison S.J., Jiang M., Milner J. Oncogenic viral protein HPV E7 up-regulates the *SIRT1* longevity protein in human cervical cancer cells // *Aging (Albany NY)*. — 2009. V. 1. — N. 3. — P. 316–327.

3. Langsfeld E.S., Bodily J.M., Laimins L.A. The deacetylase Sirtuin 1 regulates human papillomavirus replication by modulating histone acetylation and recruitment of DNA damage factors NBS1 and Rad51 to viral genomes // *PLoS Pathog.* — 2015. — e1005181.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ И ИХ КОМБИНАЦИИ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Полуконова Н.В., Фомкин Р.Н., Демин А.Г., Пылаев Т.Е., Мезиров Г.Г., Мудрак Д.А., Бучарская А.Б., Воронина Е.С., Маслякова Г.Н., Попков В.М.

ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, Россия

Введение. Рак предстательной железы (РПЖ) во всем мире занимает лидирующие позиции в структуре онкологических заболеваний у мужчин. Учитывая мультифакторный характер заболевания и вариабельность клинического течения РПЖ, важен персонализированный подход к прогнозированию риска развития РПЖ. В связи с чем актуальны поиски подходов к анализу генетических маркеров предрасположенности к РПЖ, позволяющие повысить точность диагностики и прогноза развития, в том числе у пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ).

Цель и задачи. Проанализировать по 4 генам, ассоциированным с риском развития рака простаты, отдельные генотипические сочетания аллелей и геномные комбинации у пациентов с ДГПЖ и РПЖ разных типов: высоко-(G1), умеренно- (G2) и низкодифференцированного (G3).

Материалы и методы. Методом сайт-специфической ПЦР с использованием разработанных тест-систем для детекции мононуклеотидных полиморфизмов (SNP) в 4 генах, ассоциированных с риском развития рака простаты: ген *CCAT2*, SNP — rs6983267, ген *CASC8*, SNP — rs1447295, ген *CASC17*, SNP — rs1859962, ген *HNF1B*, SNP — rs4430796, были исследованы их полиморфные варианты у 190 пациентов пяти групп: 90 пациентов с РПЖ разных типов: высоко-(G1), умеренно- (G2) и низкодифференцированного (G3), 100 пациентов с ДГПЖ; в качестве контроля использованы данные пациентов с мочекаменной болезнью (МКБ). Анализировались как генотипические сочетания аллелей по каждому гену отдельно, так и их геномные комбинации.

Основные результаты. Анализ генотипических сочетаний отдельно по разным генам показал, что пациенты с ДГПЖ и РПЖ чаще являлись носителями мутантных алле-

лей по генам: *HNF1B* (ТТ+СТ) и *CASC17* (СС+АС), однако отличий между группами ДГПЖ и РПЖ не выявлено. По гену *CASC8* пациенты с ДГПЖ и РПЖ чаще являлись носителями предкового аллеля G (GG+GT). По гену *CCAT2* пациенты с ДГПЖ и РПЖ в одинаковой степени являлись как носителями исходного аллеля G, так и мутантного аллеля T; но в группах с разными типами РПЖ преобладали гетерозиготы (GT) по сравнению с группой контроля и группой с ДГПЖ.

Всего в исследованных группах выявлено 22 геномные комбинации. Наименьшее сходство по комбинациям выявлено между группами: ДГПЖ и РПЖ G1-типа, а также контроля и РПЖ разных типов. Наибольшее сходство по комбинациям выявлено между группами РПЖ G2 и G3-типов.

Наиболее часто встречающаяся комбинацией в группах с РПЖ: ТТ (*HNF1B*) СС (*CASC17*) GG (*CASC8*) GT (*CCAT2*). На проанализированном нами материале данная комбинация отсутствовала как в группе контроля, так и в группе с ДГПЖ.

Заключение. Сравнительный анализ геномных комбинаций одновременно по ряду аллелей генов, ассоциированных с риском развития РПЖ, позволяет осуществлять персонализированный подход в онкодиагностике, но требует существенного увеличения количества пациентов в каждой из исследуемых групп с РПЖ разной степени дифференцировки с целью повышения точности диагностики и прогноза развития, в том числе у пациентов с ДГПЖ. Обнаружение геномной комбинации ТТ (*HNF1B*) СС (*CASC17*) GG (GG) GT (*CCAT2*) у пациентов с ДГПЖ может свидетельствовать о возможном переходе в РПЖ; у пациентов с МКБ — о риске развития РПЖ.

Исследование выполнено в рамках НИР (№ 121032600 197-2) по государственному заданию Минздрава РФ.

РАЗРАБОТКА И КЛИНИЧЕСКАЯ АПРОБАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ НОРМАЛИЗОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КОЛЛАГЕНА И РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕРИОДОНТА

Полуян О.С., Костюк С.А., Мельникова Т.Ю., Юдина Н.А.

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

Введение. Болезни периодонта ведущая стоматологическая проблема. Наибольшей распространенности (60-65%) периодонтит достигает у людей старше 30 лет. Установлена взаимосвязь болезней с нарушением метаболизма костной ткани организма и патологией периодонта. У пациентов с тяжелой потерей минеральной плотности кости (МПК) отмечается достоверное повышение риска тяжелых форм генерализованного периодонтита. Также отмечается значимая корреляция между потерей плотности костной ткани в периферическом скелете и потерей МПК в челюстях. Одной из задач лечения пациентов с заболеваниями периодонта становится профилактика или устранение функциональной перегрузки периодонта, которая на определенной стадии болезни оказывается одним из главных патогенетических факторов, определяющих ее течение.

Цель работы — клиническая апробация разработанного молекулярно-генетического метода определения уровней нормализованной экспрессии генов *COL1A1* и *VDR* в биологическом материале пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта.

Материалы и методы. В качестве биологического материала использовали содержимое перидонтального кармана 108 пациенток с заболеваниями периодонта, а также 15 практически здоровых женщин, составивших группу контроля. Были сформированы следующие группы пациенток: группа 1 (n=26) — с хроническим гингивитом, группа 2 (n=22) — с хроническим периодонтитом, группа 3 (n=35) — с хроническим сложным периодонтитом, группа 4 (n=25) — со сложным агрессивным периодонтитом, группа 5 (n=15) — контрольная группа. Выделение РНК из образцов биологического материала проводили с использованием наборов реагентов «АртРНК MiniSpin» (производитель «АртБиоТех», РБ). По окончании этапа пробоподготовки, препарат РНК незамедлительно использовали для постановки реакции обратной транскрипции. Расчет уровней нормализованной экспрессии целевых генов осуществлялся по формуле: % уровня экспрессии = $2^{-(Ct \text{ целевого гена} - Ct \text{ гена } HPRT1)} \times 100\%$, где Ct — пороговый цикл (cycle threshold). Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение и представлены в виде значений медиан (Me) с указанием 25/75 перцентилей: Me (25/75). Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна-Уитни (U-тест). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$.

Основные результаты. На первом этапе исследования с использованием программного обеспечения Vector NTI нами были подобраны специфические олигонуклеотидные пары праймеров (forward и reverse), а также TaqMan-зонды (probe) для определения уровней нормализованной экспрессии гена *COL1A1* и гена *VDR*. В качестве house-keeping гена использовали ген человека *HPRT1*.

Для анализа возможности использования подобранных пар праймеров и зондов при определении экспрессии исследуемых генов последовательно проводили мультиплексную ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-PB). Амплификацию для каждого гена проводили в 10 образцах, пробы ставили в дублях.

Для оценки эффективности протекания ПЦР проводили амплификацию 10-кратных разведений образцов кДНК, с целью построения стандартной кривой. Концентрацию кДНК в неразведенном образце условно принимали за 100 и делали 2 разведения (10, 1). Амплификацию проб проводили в дублях.

При анализе результатов амплификации проводили построение стандартной кривой корреляции между значениями пороговых циклов Ct и \log_{10} условной концентрации кДНК для изучаемого гена. Для гена *COL1A1* корреляции (R^2) между значениями пороговых циклов Ct и \log_{10} условной концентрации кДНК в образце составила 0,997. Полученное значение эффективности ПЦР составило 1,61. Для гена *VDR* корреляции (R^2) между значениями пороговых циклов Ct и \log_{10} условной концентрации кДНК в образце составила 0,998. Полученное значение эффективности ПЦР составило 1,72.

Количественное определение house-keeping гена проводили в тех же образцах, в которых оценивали амплификацию исследуемых целевых генов, для оценки концентрации применяли плазмидный стандарт. Амплификацию всех проб проводили в дублях, для расчета коэффициента вариации использовали средние значения концентраций.

В ходе оптимизации мультиплексной ПЦР-PB в одной пробирке одновременно амплифицировали исследуемый ген (*COL1A1* или *VDR*) и референсный ген *HPRT1*. Детекцию целевого гена проводили по каналу «Green», так как зонды были мечены флуорофором FAM, а детекцию гена *HPRT1* проводили по каналу «Orange», т.к. зонд для него был мечен флуорофором ROX.

Состав амплификационной смеси были следующим: 19 мкл Platinum PCR SuperMix, 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда целевого гена, 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда для гена *HPRT1* и 3 мкл кДНК.

Программа амплификации: 95°C — 15 мин (1 цикл); 50 циклов 95°C — 20 с, 58°C — 20 с, 72°C — 15 с; 72°C — 10 мин (1 цикл).

При выполнении молекулярно-генетических исследований установлено, что уровни нормализованной экспрессии гена *COL1A1* для группы 1 составили Me (Q25/75) 123,54 (95,69/179,71)%, для группы 2 — 46,05 (20,59/126,08)%, для группы 3 — 22,38 (11,66/52,12)%, для группы 4 — 35,60 (14,95/215,21)%, для группы 5 — 338,70 (232,95/499,33)%. На основании проведенного статистического анализа установлено наличие достоверных ($p < 0,05$) различий между обследуемыми группами, за исключением групп 1-4, 2-3, 2-4 и 3-4.

Затем нами были проведены аналогичные исследования по определению уровней нормализованной экспрессии гена *VDR*. Для группы 1 значения Me (Q25/75) составили 25,61 (10,16/50,35)%, для группы 2 — 28,79 (6,68/73,05)%, для группы 3 — 36,07 (10,42/82,44)%, для группы 4 — 35,67 (12,67/82,84)%, для группы 5 — 22,47 (9,74/45,56)%. При использовании непараметрического критерия Манна-Уитни установлено от-

сутствие статистически значимых ($p < 0,05$) достоверных различий по анализируемому признаку для всех групп.

Заключение. При клинической апробации разработанного метода рассчитаны количественные показатели уровней нормализованной экспрессии генов *COL1A1* и *VDR* в образцах биологического материала пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта. Использование непараметрических методов статистического анализа позволило установить отсутствие ($p > 0,05$) статистически значимых достоверных различий в уровнях нормализованной экспрессии гена *VDR*, тогда для гена *COL1A1* такие различия установлены ($p < 0,05$), за исключением случаев сравнения пациентов с хроническим гингивитом (группа 1), хроническим периодонтитом (группа 2) и хроническим сложным периодонтитом (группа 3) с пациентами со сложным агрессивным периодонтитом (группа 4), а также при сравнении полученных данных по уровням нормализованной экспрессии между пациентами с хроническим периодонтитом (группа 2) и хроническим сложным периодонтитом (группа 3).

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНОВ, УЧАСТВАЮЩИХ В ФОРМИРОВАНИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ, У ПАЦИЕНТОВ С ДИВЕРТИКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ

Полуян О.С., Костюк С.А., Воробей А.В., Дыбов О.Г.

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

Введение. Дивертикулярная болезнь ободочной кишки является мультифакторным генетически опосредованным заболеванием желудочно-кишечного тракта. В настоящее время ведутся полномасштабные исследования по поиску и идентификации генетических локусов, а также установлению их биологической вероятностной роли в развитии дивертикулярной болезни.

Цель работы — установить уровни нормализованной экспрессии генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1*, участвующих в формировании соединительной ткани, в пунктатах тканей ободочной кишки пациентов с дивертикулярной болезнью.

Материалы и методы. Для проведения молекулярно-генетических исследований в качестве биологического материала использовали интраоперационные биоптаты: 35 образцов слизистой оболочки патологических участков неосложненных дивертикулов (группа 1), 19 образцов слизистой оболочки патологических участков осложненных дивертикулов (группа 2), 37 образцов слизистой оболочки участков здоровой кишки без дивертикулов пациентов с дивертикулярной болезнью ободочной кишки (группа 3); а также 8 образцов стенки кишки пациентов, оперированных по поводу рака ободочной кишки без признаков непроходимости и долихоколон (контрольный материал — группа 4).

Выделение РНК из пунктатов тканей ободочной кишки осуществлялось в несколько этапов, включая предварительное удаление раствора RNeasy Lysis Buffer (Sigma) перед экстракцией и гомогенизацию образцов, с использованием

набора реагентов «АртРНК MiniSpin» (ООО «АртБиоТех», РБ). Для проведения обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) одношаговым методом использовали набор реагентов BioMaster ОТ-ПЦР SYBR Blue (2x) (ООО «Биолабмикс», РФ), специально подобранные пары праймеров (ОДО «Праймтех», РБ) для каждого гена, включая house-keeping ген; постановку реакции ОТ-ПЦР-РВ осуществляли с использованием термоциклера-амплификатора «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия) с соответствующим программным обеспечением. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение и представлены в виде значений медианы и квартилей (Me (Q25/75)). Для характеристики частоты изучаемых признаков использовали абсолютные показатели. Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна-Уитни с целью сравнения величин измерений признака. Критическим принят уровень значимости $p < 0,05$.

Основные результаты. На основании проведенных молекулярно-генетических исследований установлено, что уровни нормализованной экспрессии гена *COL6A1* для группы 1 составили Me (Q25/75) 117,82 (36,55/173,36)%, для группы 2 — 33,81 (23,77/55,35)%, для группы 3 — 114,50 (37,49/171,19)%, для группы 4 — 336,17 (190,38/677,58)%. Установлено, что при дивертикулярной болезни ободочной кишки наблюдается снижение экспрессии коллагена VI типа с

биоптатах тканей участков стенки кишки без дивертикулов, с осложненными и неосложненными дивертикулами. Данный факт подтверждает имеющиеся данные о роли *COL6A1* в построении экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) и обеспечении активности мышечной функции. Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило выявить наличие статистически значимых различий по данному параметру между группами 1-2 ($Z=-2,409$, $p=0,015$), 1-4 ($Z=-3,213$, $p<0,001$), 2-3 ($Z=-2,465$, $p=0,013$), 2-4 ($Z=-2,908$, $p=0,002$), 3-4 ($Z=-3,414$, $p<0,001$). Для групп 1-3 ($Z=-0,082$, $p=0,935$) статистически значимых достоверных различий не было.

При проведении молекулярно-генетических исследований по определению уровней нормализованной экспрессии гена *S100A10* нами были установлены следующие значения Me ($Q_{25}/75$): для группы 1 — 106,00 (83,42/122,05)%, для группы 2 — 104,04 (89,97/144,31)%, для группы 3 — 126,57 (95,73/136,22)%, для группы 4 — 9,87 (3,888/29,69)%. Увеличение экспрессии гена кальций-связывающего белка *S100A10* в пунктах тканей участков стенки кишки приводит к разрушению и деградации ЭЦМ вследствие фибринолиза и действия металлопротеиназы. Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило выявить наличие статистически значимых различий по данному параметру только при проведении попарных сравнений с группой 4 (контрольный материал пациентов без дивертикулярной болезни ободочной кишки): для групп 1-4 $Z=-3,464$, $p<0,001$, 2-4 $Z=-3,204$, $p<0,001$, 3-4 $Z=-3,464$, $p<0,001$; тогда как для всех остальных групп выявленных различия в экспрессии гена были статистически достоверными: для групп 1-2 $Z=-0,925$, $p=0,367$, 1-3 $Z=-1,770$, $p=0,077$, 2-3 $Z=-0,392$, $p=0,709$.

На основании проведенных молекулярно-генетических исследований по определению уровней нормализованной экспрессии гена *ELN* установлено, что для группы 1 Me ($Q_{25}/75$) составило 54,17 (39,18/103,75)%, для группы 2 — 56,34 (26,16/90,40)%, для группы 3 — 56,69 (37,04/106,53)%, для группы 4 — 234,44 (132,77/472,53)%. Различающиеся уровни нормализованной экспрессии гена *ELN* в пунктах тканей участков ободочной кишки пациентов с дивертикулярной болезнью по сравнению с контрольным материалом свидетельствуют о роли данно-

го гена в развитии заболевания: *ELN* является основным компонентом ЭЦМ, обеспечивающим его эластичность и стабильность. Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило выявить наличие статистически значимых различий по данному параметру между группами 1-4 ($Z=-3,364$, $p<0,001$), 2-4 ($Z=-3,204$, $p<0,001$) и 3-4 ($Z=-3,414$, $p<0,001$). При проведении статистического анализа между группами пациентов с дивертикулярной болезнью (группы 1-3) статистически значимых достоверных различий выявлено не было: для групп 1-2 $Z=-1,009$, $p=0,324$, 1-3 $Z=-0,197$, $p=0,844$, 2-3 $Z=-1,009$, $p=0,324$.

На заключительном этапе нами были проведены молекулярно-генетические исследования по установлению уровней нормализованной экспрессии гена *TAC1*: для группы 1 Me ($Q_{25}/75$) составило 154,55 (118,79/182,57)%, для группы 2 — 148,47 (128,12/244,34)%, для группы 3 — 180,23 (136,33/206,03)%, для группы 4 — 14,06 (5,53/42,28)%. Усиление экспрессии гена *TAC1* является маркером местной воспалительной реакции. При использовании непараметрического критерия Манна-Уитни установлены статистически значимых различий по параметру между группами 1-4 ($Z=-3,464$, $p<0,001$), 2-4 ($Z=-3,204$, $p<0,001$) и 3-4 ($Z=-3,464$, $p<0,001$), тогда как для групп 1-2 ($Z=-1,093$, $p=0,285$), 1-3 ($Z=-1,376$, $p=0,169$) и 2-3 ($Z=-0,252$, $p=0,814$) таких различий не было.

Заключение. На основании проведенных молекулярно-генетических исследований по определению уровней нормализованной экспрессии генов *COL6A1*, *S100A10*, *ELN*, *TAC1* установлено, что при дивертикулярной болезни ободочной кишки наблюдается статистически значимое ($p<0,01$) достоверное снижение уровней экспрессии генов *COL6A1* и *ELN* на фоне статистически достоверного ($p<0,01$) увеличения уровней экспрессии генов *S100A10* и *TAC1* по сравнению с контрольным материалом пациентов без дивертикулярной болезни; при этом статистически достоверные различия между группами пациентов с дивертикулярной болезнью выявлены только для гена *COL6A1*. Изменение экспрессии указанных генов приводит к нарушению строения экстрацеллюлярного матрикса (*COL6A1*), снижению его эластичности (*ELN*), деструкции и деградации (*S100A10*), сопровождающимся воспалением (*TAC1*).

МИНИСАТЕЛЛИТНЫЕ ПОВТОРЫ ГЕНОВ *VDKRB2*, *5-HTT* И *DAT1* КАК БИОМАРКЕРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ И ИНФАРКТА МИОКАРДА У ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Сучкова И.О.¹, Дергачева Н.И.¹, Соколова В.А.¹, Сасина Л.К.¹, Фирова Э.М.², Мамедова З.Э.², Мещерякова Н.Г.², Агибалова Л.Т.², Шурпач С.Л.², Муружева З.М.², Татаринцев А.Е.², Паткин Е.Л.¹

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² Клиника ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Гипертоническая болезнь (ГБ), ишемическая болезнь сердца (ИБС), их кардиологические и церебральные осложнения, в частности инфаркт миокарда (ИМ) и дисциркуляторная энцефалопатия (ДЭ), являются чрез-

вычайно серьезными медицинскими и социальными проблемами. Результаты многих исследований указывают на то, что перспективными биомаркерами риска развития ГБ и ИБС могут быть не только мутации и однонуклеотидные

полиморфизмы в генах-кандидатах, но и полиморфизмы tandemно-повторяющихся некодирующих последовательностей ДНК. Владение такой генетической информацией может способствовать не только ранней диагностике сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний, но и прогнозированию риска развития различных сосудистых катастроф, а также выбрать более эффективное персонализированное терапевтическое лечение.

Цель. Провести анализ ассоциаций минисателлитов B2-VNTR гена рецептора B2 брадикинина (*BDKRB2*), 5-HTTLPR и STin2 гена транспортера серотонина (*5-HTT*) и DAT1-vntr гена транспортера дофамина (*DAT1*) с риском развития дисциркуляторной энцефалопатии при ГБ и ИБС.

Материалы и методы. Исследование одобрено ЛЭК ФГБНУ «ИЭМ» (протоколы № 3/19 от 25.04.2019 и № 2/21 от 27.05.2021). ДНК выделяли из лейкоцитов периферической венозной крови пациентов, проходивших плановое лечение в клинике ФГБНУ «ИЭМ». Группа с ГБ (N = 111) была представлена 43 мужчинами (M ± SD: 45,0 ± 14,5 лет) и 68 женщинами (54,0 ± 12,3 лет). Группа с ИБС (N = 296) состояла из 97 мужчин (64,5 ± 9,5 лет) и 199 женщин (70,9 ± 9,9

лет). Контрольная группа добровольцев включала в себя 78 мужчин (52,1 ± 26,1 лет) и 111 женщин (47,7 ± 24,0 лет). Генотипирование проводили с помощью ПЦР с последующим разделением продуктов амплификации в 6% ПААГ. Условия ПЦР описаны в работах [1-4]. Статистическую обработку проводили с помощью критериев χ^2 и Фишера (vassarstats.net).

Результаты. По сравнению с контролем не обнаружено статистически значимых различий по частоте аллелей B2-VNTR и 5-HTTLPR (Таблица). В тоже время для STin2 выявлено повышение частоты аллеля 10 и снижение частоты аллеля 12 у женщин с ГБ и ИБС, причем у пациентов с ИБС это наблюдалось только в случае наличия ДЭ в анамнезе.

У пациентов с ГБ не обнаружено изменений частоты аллелей DAT1-vntr по сравнению с контролем, тогда как у мужчин с ИБС, осложненной ДЭ, наблюдалось повышение частоты аллеля 10 (77,2%) (Таблица), причем среди таких пациентов, перенесших ИМ, частота аллеля 10 составляла 81,8% vs 64,4% в контроле ($p = 0,016$). В тоже время у женщин с ИБС, осложненной ДЭ и ИМ, частота аллеля 10 DAT1-vntr была 87,0% vs 69,1% в контроле ($p = 0,018$)

ТАБЛИЦА. ЧАСТОТА АЛЛЕЛЕЙ B2-VNTR, 5-HTTLPR, STIN2 И DAT1-VNTR У ПАЦИЕНТОВ С И БЕЗ ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ ПРИ ГБ И ИБС

Аллели	Мужчины					Женщины				
	Контроль	ГБ		ИБС		Контроль	ГБ		ИБС	
		без ДЭ	+ ДЭ	без ДЭ	+ ДЭ		без ДЭ	+ ДЭ	без ДЭ	+ ДЭ
Всего, N	156	64	22	58	136	222	54	82	102	296
B2-VNTR:										
43 повтора	80,8	85,9	95,5	89,7	88,2	84,2	87,0	86,6	89,2	87,8
33 повтора	17,9	14,1	4,6	10,3	10,3	15,3	13,0	12,2	10,8	10,8
38 повторов	1,3	0	0	0	1,5	0,5	0	1,2	0	1,4
<i>p</i>		0,439	0,131	0,151	0,106		0,865	0,719	0,303	0,247
5-HTTLPR:										
Long (528 bp)	60,0	64,1	81,8	65,5	62,5	65,7	74,1	74,4	67,7	64,9
Short (484 bp)	40,0	35,9	18,2	34,5	37,5	34,3	25,9	25,6	32,3	35,1
<i>p</i>		0,649	0,060	0,529	0,719		0,262	0,167	0,801	0,852
STin2:										
12 повторов	64,0	71,9	45,5	65,5	66,2	69,5	51,9	51,2	61,8	57,8
10 повторов	34,7	28,1	54,5	34,5	33,1	29,9	48,1	43,9	33,3	39,2
9 повторов	1,3	0	0	0	0,7	0,6	0	4,9	4,9	3,0
<i>p</i>		0,277	0,104	0,873	0,735		0,016	0,003	0,163	0,006
DAT1-vntr:										
10 повторов	64,4	65,6	63,6	79,3	77,2	69,1	74,1	70,7	73,5	74,7
9 повторов	34,7	31,3	31,8	20,7	22,1	30,2	22,2	28,1	24,5	25,0
Редкие (11, 6 и 4 повтора)	0,9	3,1	4,6	0	0,7	0,7	3,7	1,2	2,0	0,3
<i>p</i>		1,000	1,000	0,047	0,021		0,511	0,781	0,433	0,165

Выводы. Полиморфизм длины аллелей STin2 у женщин может быть связан с риском развития ГБ, а также ДЭ при ИБС. При ИБС потенциальным биомаркером развития неврологических (ДЭ) и кардиологических (ИМ) осложнений, может являться аллель 10 DAT1-vntr.

Финансирование. Работа выполнена в рамках гос. задания — НИР № 0424-2020-0007.

Список литературы

1. Hranilovic D. et al. Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants

and gene expression. *Biol Psychiatry*. 2004. 55(11): 1090-1094.

2. Kang A.M. et al. Global variation of a 40-bp VNTR in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene (SLC6A3). *Biol Psychiatry*. 1999. 46:151-160.

3. Nakamura N. et al. The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Mol Psychiatry*. 2000. 5(1):32-38.

4. Suchkova I.O. et al. Length polymorphism of the B2-VNTR minisatellite repeat of the bradykinin B2 receptor gene in healthy russians and patients with coronary heart disease. *Molecular Biology*. 2014. 48(5):655-663.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА RS1800449 (LOX G473A) СРЕДИ БОЛЬНЫХ ПОДРОСТКОВЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ СКОЛИОЗОМ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Буслов К.Г., Хальчицкий С.Е., Грачева Ю.А., Филиппова А.Н., Виссарионов С.В.

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр детской травматологии и ортопедии им. Г.И. Турнера Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Идиопатический сколиоз (ИС) — заболеванием позвоночника, которое встречается у 2–4% у совершенно здоровых в остальных отношениях детей и подростков. Этиология и патогенез данного заболевания не ясны и остаются предметом исследований. Общепринятая точка зрения на ИС как многофакторное заболевание, которое развивается под воздействием условий внешней среды у людей, генетически предрасположенных к развитию ИС. К настоящему времени идентифицировано множество перспективных генетических маркеров риска и прогрессирования ИС, влияние которых, однако, не было подтверждено в репликативных исследованиях. Считается, что основной причиной несовпадений в результатах исходных и репликативных исследований являются этнические, популяционные различия, а также малые размеры исследуемых групп. Для повышения чувствительности исследования нами применен подход, основанный на сравнении в группах крайнего высокого и низкого риска относительно изучаемого заболевания.

Данные по исследованию ассоциации ИС и полиморфными вариантами в нескольких генах, кодирующих лизилоксидазы (LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3, и LOXL4) были опубликованы McGregor T.L. в 2011 г., однако в этой работе вариант rs1800449 (LOX G473A) не изучался. Целью настоящей работы стало изучение ассоциации между полиморфизмом rs1800449 (LOX G473A) и ИС в российской популяции.

Материалы и методы. В исследование были включены 129 пациентов с ИС и 135 здоровых добровольцев. Проведение исследования было одобрено локальным Этическим комитетом.

У всех пациентов наблюдалась прогрессирующая форма ИС в стадии 3 или 4, согласно критериям SRS

(Scoliosis Research Society). Пациенты с вторично развившимся сколиозом вследствие другого заболевания в исследование не включались. Здоровые добровольцы привлекались в исследование в контрольную группу после медицинского осмотра и не имели в анамнезе ортопедической патологии.

Выделение геномной ДНК проводилось из цельной крови с использованием коммерческого набора реагентов («Синтол», Москва). Анализ однонуклеотидной замены полиморфизма rs1800449 (LOX G473A) был выполнен у всех пациентов и лиц контрольной группы. Генотипирование проводилось методом полимеразной цепной реакции с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). ПЦР выполнялась в объеме 25 мкл в присутствии 200 нМ каждого из прямого и обратного праймеров (5'-GGTTGTCGTCAGACTTGG-3' и 5'-ACGGCCGGCTCATCTGGA-3', соответственно), 0,25 U Hot StartTaq SE полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск) в соответствующем буфере, в присутствии 2,5 мМ MgCl₂, 1 мкМ смеси дезоксинуклеотидов (dNTP) и 1 мкл раствора очищенной ДНК. После начального прогрева 95о в течение 5 минут проводилось 35 циклов, состоящих из шагов денатурации при 95о по 10 сек., отжига праймеров при 60о по 20 сек. и синтеза при 72о по 20 сек. Полученные в ПЦР фрагменты ДНК размером 229 пар оснований (п.о.) в дальнейшем подвергались инкубации в присутствии эндонуклеазы рестрикции Hae III («СибЭнзим», Новосибирск) в условиях, рекомендованных компанией-производителем. Размеры фрагментов ДНК, полученных после инкубации с эндонуклеазой рестрикции Hae III составляли: 190 п.о.+ 30 п.о. и 120 п.о.+ 70 п.о.+ 30 п.о. для аллельных вариантов –G и –A, соответственно. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводилось в 10% полиакриламидном геле.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием онлайн-калькулятора Social Science Statistics (<https://www.socscistatistics.com/>). Для сравнения распределения генотипов и аллелей между группами пациентов и контролей применялся тест хи-квадрат при уровне статистической значимости $p < 0.05$.

Результаты. Проведенное исследование распределения генотипов и аллелей полиморфизма rs1800449 (LOX G473A) показало, что редкий аллель LOX 473A выявлен у 19% пациентов ИС и 20% здоровых лиц контрольной группы. Частоты генотипов GA и AA составили 26% и 6% в группе пациентов и 34% и 3% в контрольной группе, соответственно. Не было найдено статистически значимых различий между пациентами и контрольной группой при анализе распределения частот генотипов и аллелей. Также не были найдены различия при сравнении подгрупп пациентов и контрольной группы только мужского и женского пола.

Обсуждение. Лизилоксидаза — фермент, участвующий в сшивании молекул коллагена 1 типа (основного типа коллагена соединительной ткани — более 90%) в прочную и жесткую микроскопическую сеть. Эта коллагеновая сеть служит основой для связок и фасций, каркасом для мышечных волокон, нервов, сосудов и капилляров, образует микроstromу тканей. Также на её основе формируются минерализованные костные ткани. Показано, что жесткость некоторых костно-мышечных связок у спортсменок изменяется в зависимости от фазы менструального цикла. Взаимосвязь между развитием идиопатического сколиоза и половыми гормонами неоднократно отмечалась в клинических, эпидемиологических и лабораторных исследованиях. В лабораторных исследованиях также было показано влияние эстрогенов на синтез коллагена и активность

лизилоксидазы, которое носит нелинейный характер. Вероятно, это обусловлено тем, что влияние эстрогенов на активность лизилоксидазы опосредовано рецептором ER1, активность которого, в свою очередь, также изменяется нелинейно под действием эстрогенов. В нескольких независимых молекулярно-эпидемиологических исследованиях было показано, что полиморфизм rs1800449 (LOX G473A) ассоциирован с повышенным в 2.79 раз риском рака молочной железы, рака яичника (OR = 2.52), коронарной болезни (OR = 1.93), что может свидетельствовать о том, что указанный полиморфизм обладает функциональной и клинической значимостью.

В нашем исследовании ассоциации генетического варианта rs1800449 (LOX G473A) с развитием ИС у пациентов в российской популяции был применен подход, основанный на сравнении частот аллелей в группах крайнего риска в отношении развития ИС, где сравниваются: с одной стороны — группа пациентов молодого возраста с тяжелыми прогрессирующими формами ИС, а с другой стороны — контрольная группа, представленная главным образом взрослыми людьми, вероятность развития ИС у которых стремится к нулю.

Редкий аллельный вариант -A полиморфизма rs1800449 был обнаружен нами у 18% пациентов и у 20% лиц в контрольной группе, что согласуется с данными популяционной частоты аллелей, представленными в базе SNP database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1800449>). Результаты, полученные в нашем исследовании, не подтверждают роль данного полиморфизма в развитии ИС.

Заключение. Генетический однонуклеотидный полиморфизм SNV rs1800449 в гене LOX не ассоциирован с развитием идиопатического сколиоза в российской популяции.

ВКЛАД ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *GSTO1* В ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ПСОРИАЗУ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Саранюк Р.В.^{1*}, Бушуева О.Ю.², Ефанова Е.В.³, Полоникова А.А.², Полоников А.В.²

¹ ООО «Центр медицинских осмотров и профилактики», Курск

² ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск

³ ОБУЗ Медвенская центральная районная больница, Курск

*e-mail: roman.saranuk@gmail.com

Актуальность. Псориаз представляет собой мультифакториальное гетерогенное заболевание кожи с наследственной предрасположенностью, резко снижающее качество жизни пациентов и приводящее к развитию широко спектра коморбидных расстройств. Изменение редокс-баланса в сторону избыточной генерации свободных радикалов является одной из причин манифестации и рецидивов заболевания.

Цель и задачи. Изучения ассоциации полиморфизмов гена *GSTO1* с риском развития псориаза у жителей Центральной России.

Материалы и методы. Исследование проведено на этнически гомогенной выборке неродственных жителей

Центральной России славянского происхождения общей численностью 944 человека, включая 474 пациента с псориазом (252 мужчины и 222 женщины) и 470 человек из группы контроля. Генотипирование 5 полиморфизмов гена *GSTO1* было с помощью лазерной десорбционно/ионизационной время-пролетной масс-спектрометрии на платформе MassArray Analyzer 4. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью онлайн программы PLINK, которая позволяла оценивать ассоциации посредством пермутационного теста. Ассоциации считались значимыми при $P_{perm} < 0,05$.

Основные результаты. Сравнение групп больных и здоровых не выявил статистически значимых ассоциаций

полиморфных вариантов гена *GSTO1c* риском развития псориаза. Однако пол-стратифицированный анализ позволил установить ассоциации полиморфизма rs11191736 с риском развития псориаза у мужчин ($P_{perm}=0,017$) и полиморфизма rs187304410 гена *GSTO1* с риском развития псориаза у женщин ($P_{perm}=0,012$).

Выводы. В ходе исследования впервые была установлено, что полиморфные варианты гена *GSTO1* ассоциированы с риском развития псориаза, однако различные полиморфизмы вносили вклад в предрасположенность к болезни у мужчин и женщин.

ЗНАЧЕНИЕ СОЧЕТАНИЯ НЕКОТОРЫХ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК У ДЕТЕЙ

Седашкина О.А., Порецкова Г.Ю., Маковецкая Г.А.

ФГОУВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Россия

Актуальность. Изучение клинко-генетических особенностей ХБП актуально, и несмотря на то, что в настоящее время проводятся генетические исследования, поиск маркеров единичный и результаты исследований противоречивы. Не проводилась комплексная оценка полиморфизма генов ренин-ангиотензиновой системы у детей с разными нозологическими формами нефропатий.

Цель исследования. Установить особенности полиморфизма генов *ACE (D/I)*, *AGT (Thr174Met)*, *AGT (Met235Thr)* и *AGTR1 (A1166C)* у детей с ХБП и определить их роль в прогрессировании заболевания.

Методы. В ретроспективное и проспективное когортное исследование включены 100 детей с нефропатиями от 1 года до 17 лет, обследованные в детском нефрологическом отделении Самарской областной больницы в течение 10 лет. Детям проведена идентификация однонуклеотидных полиморфизмов генов с помощью аллель-специфичной полимеразной цепной реакции

амплификации с использованием тест — систем производства НПФ «ЛИТЕХ» после выделения ДНК из биоматериала с помощью наборов «ДНК — ЭСПРЕСС-КРОВЬ». Оценка клинко-параклинических маркеров прогрессирования ХБП проводилась 2 раза в год.

Результаты. При патологии почек у детей выявлена тенденция к увеличению частоты встречаемости однонуклеотидных полиморфизмов генов, влияющих на ренин-ангиотензиновую систему (РАС). У пациентов с ХБП 3-5 стадией, которые составили 35% аллели *D/D ACE* сочетались с аллелями *AGT Thr174Met* (27,9±6,83%) и *Met235Thr* (41,86±7,5%), *Thr235Thr* (30,2±7,0%) и *AGTR1 A1166C* (37,2±7,32%) чаще, чем при легкой степени ХБП (0 и 7,5±3,37%; 5,2±2,94% и 5,2±2,94%; соответственно, $p \leq 0,010$).

Выводы. Определение клинко-генетических особенностей ХБП необходимо для выделения групп риска и своевременного проведения превентивных мероприятий.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *GIPR* И УРОВЕНЬ ИНСУЛИНА У ДЕТЕЙ

С. Тоннанг Момо, Е.В. Машкина

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Актуальность. Ожирение является серьезной проблемой для здоровья человека. Как мультифакторное состояние ожирение — это результат взаимодействия экзогенных и эндогенных факторов, связанных с потреблением и расходом энергии человеком. Вклад генетических факторов в развитие ожирения может составлять до 80%. Однако конкретные молекулярные механизмы формирования избыточной массы тела, особенно у детей, требуют дальнейших исследований.

Желудочный ингибирующий полипептид (GIP) относится к классу кишечных секретин, синтезируемых К-клетками двенадцатиперстной кишки и тонкой кишки. Основным действием GIP является стимуляция глюкозозависимой секреции инсулина. Данный эффект GIP реализуется через рецептор (GIPR). Активация *GIPR* стиму-

лирует выработку инсулина, гидролиз триглицеридов и липогенез.

Однонуклеотидные замены в гене *GIPR* могут привести к изменению активности рецептора.

Цель. В данной работе мы исследовали ассоциацию rs8111428 (A>G) *GIPR* с уровнем инсулина и формированием избыточной массы тела у детей.

Материал и методы. Наше исследование проводилось с использованием ДНК, выделенной из крови 208 детей в возрасте от 2 до 12 лет. Образцы были разделены на 2 группы: контрольная группа ($n=86$) с нормальным индексом массы тела (ИМТ составил $18,2 \pm 0,12$) и группа детей с избыточным весом ($n=122$, ИМТ = $23,6 \pm 0,25$). Генотипирование проводили методом T-ARMS-PCR с последующей электрофоретической детекцией. Уровень инсу-

лина в крови определяли методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Распределение частот генотипов по исследуемому полиморфизму в контрольной группе и в группе с избыточным весом и ожирением соответствует равновесию Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 2.35$ и $\chi^2 = 0.02$ соответственно). Мы наблюдали преобладание гомозигот по дикой аллели А в обеих исследуемых группах (73,3% и 61,5%), доля гомозигот по аллели G составила 4,65% в контроле и 4,92% среди детей с избыточным весом. Разница в распределении частот генотипов и аллелей между группами детей статистически не значима ($p = 0,18$ и $p = 0,16$ соответственно). Однако установлено, что у детей с избыточным весом, являющихся гетерозиготами по

rs8111428 *GIPR* уровень инсулина в периферической крови (22,1 мМЕ/л) статистически значимо выше по сравнению с детьми из контрольной группы, имеющими такой же генотип (12,2 мМЕ/л) ($p = 0,0002$). Значимой разницы в уровне глюкозы в зависимости от массы тела и генотипа по исследуемому полиморфизму гена *GIPR* не выявлено.

Выводы. Гетерозиготность по rs8111428 гена *GIPR* ассоциирована со статистически значимым повышением уровня инсулина в периферической крови детей с избыточной массой тела.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ НЕРАВНОВЕСИЯ ПО СЦЕПЛЕНИЮ И АССОЦИИИ ПОЛИМОРФНЫХ АЛЛЕЛЕЙ –819Т/С rs1800871 и –592С/А rs1800872 ГЕНА *IL10* С ТРУБНЫМ ФАКТОРОМ БЕСПЛОДИЯ

Бутенко Е.В.¹, Диденко Я.В.¹, Лянгасова О.В.¹, Ломтева С.В.²

¹ Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

² Центр репродукции и ЭКО, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Интерлейкин 10 (*IL10*) — противовоспалительный цитокин, принимающий участие во многих физиологических и патогенетических процессах, в основе которых лежит воспаление. Воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) играют ведущую роль в нарушении репродуктивного здоровья женщин. ВЗОМТ являются основной причиной возникновения трубно-перитонеальной формы бесплодия (ТПФБ). Мутации в регуляторной области гена *IL10* модулируют количество и активность вырабатываемого клетками интерлейкина 10, тем самым могут влиять на течение ВЗОМТ и возникновение трубно-перитонеальной формы бесплодия. Полиморфные аллели –819Т/С и –592С/А гена *IL10* хорошо охарактеризованы и изучены в связи с патогенезом самых разных заболеваний, но исследования их связи с развитием ТПФБ не проводились до настоящего времени. Данные по наличию неравновесного сцепления однонуклеотидных полиморфизмов –819Т/С и –592С/А гена *IL10* разнятся в зависимости от исследуемой популяции от полного отсутствия сцепления до тесного сцепления. В связи с этим была поставлена цель исследования: провести анализ структуры неравновесия по сцеплению и ассоциации полиморфных аллелей –819Т/С и –592С/А гена *IL10* с трубным фактором бесплодия.

Материалы и методы: Сбор образцов проводили на базе Центра репродукции и ЭКО г. Ростова-на-Дону. Контрольную группу составили 31 женщина с диагнозом мужской фактор бесплодия (код МКБ 97.4), в исследуемую группу вошли 30 женщин с диагнозом трубный фактор бесплодия (код МКБ 97.1). В контрольную и исследуемую группы были включены женщины без сопутствующих патологий в анамнезе. Материалом

для молекулярно-генетических исследований служила венозная кровь. Генотипирование проводили методом ПЦР с использованием коммерческих наборов фирмы Литех, Россия. Частоты генотипов и аллелей, соответствие равновесию Харди-Вайнберга, отношение шансов и анализ неравновесия по сцеплению были проведены с использованием критерия хи-квадрат и коэффициентов D и D' в программе «SNPstats» (<https://www.snpstats.net/start.htm>).

Результаты: Частоты распределения генотипов и аллелей по полиморфным вариантам

–819Т/С и –592С/А гена *IL10* соответствовали распределению Харди-Вайнберга как в контрольной, так и в исследуемой группах. Частота встречаемости минорного аллеля

–592А в контрольной группе составила 25%, в исследуемой группе — 32%. Частота встречаемости минорного аллеля –819С в контрольной группе составила 23%, в исследуемой группе — 28%. Частоты встречаемости генотипов по исследуемым полиморфным аллелям, значения отношения шансов представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы, частота встречаемости гомозигот по минорным вариантам однонуклеотидных полиморфизмов rs1800871 и rs1800872 выше в группе с ТПФБ, но статистических анализ не показал достоверности этих отличий при $p < 0,05$.

Анализ неравновесия по сцеплению выявил тесное сцепление исследованных локусов ($D' = 0,82$). Наиболее часто встречались гаплотипы С (rs1800872) Т (rs1800871) — 68% и АС — 22%, менее распространены гаплотипы АТ — 6% и СС — 4%. Ассоциации гаплотипов с наличием ТПФБ выявлено не было.

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ ПО ПОЛИМОРФНЫМ АЛЛЕЛЯМ –819Т/С (RS1800871) И –592С/А (RS1800872) ГЕНА *IL10* В ГРУППЕ ЖЕНЩИН С ТРУБНО-ПЕРИТОНИАЛЬНЫМ ФАКТОРОМ БЕСПЛОДИЯ (ТПФБ) И В ГРУППЕ ЖЕНЩИН С МУЖСКИМ ФАКТОРОМ БЕСПЛОДИЯ (КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ)

Ген, полиморфизм	Генотип	Контрольная группа	Группа ТПФБ	p	ОШ (95% ДИ)
–592С/А, <i>IL10</i>	СС	54%	48%	0,59	1
	СА	42%	40%		1,08 (0,33-3,51)
	АА	4%	12%		3,25 (0,30-35,66)
–819Т/С, <i>IL10</i>	ТТ	56%	52%	0,25	1
	ТС	46%	40%		0,91 (0,29 — 2,87)
	СС	0	8%		0 (не определено)

Заключение. В результате проведенных исследований ассоциации полиморфных аллелей –819Т/С и –592С/А гена *IL10* с трубным фактором бесплодия выявлено не было, хотя частота гомозигот по минорным аллелям была выше в группе женщин с ТПФБ. Установлено тесное сцепление исследуемых локусов и наиболее часто встречающийся гаплотип С (rs1800872) Т (rs1800871).

Распространенность гаплотипа с сочетанием двух аллелей дикого типа может указывать на их эволюционное значение.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК *TUG1* В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНИ

Васильева А.В.¹, Курбатова И.В.¹, Топчиева Л.В.¹, Дуданова О.П.², Шиповская А.А.²

¹ Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», 198910, Россия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петрозаводский государственный университет», 185910, Россия, г. Петрозаводск, ул. Ленина, 33

Введение. Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) — широко распространенное (по различным данным, от 20 до 40% населения планеты страдают НАЖБП), многофакторное метаболическое заболевание, которое является основной причиной заболеваемости и смертности, связанной с болезнями печени, в экономически развитых странах. В России НАЖБП в настоящее время занимает лидирующие позиции среди заболеваний внутренних органов [1]. В связи с этим, актуальным становится поиск молекул, имеющих потенциальное прогностическое и клиническое значение при НАЖБП. В качестве таких молекул рядом исследователей предлагаются длинные некодирующие РНК (днРНК). В настоящем исследовании для изучения выбрана днРНК *TUG1*, для которой показано участие в развитии гепатоцеллюлярной карциномы, в развитии фиброза печени, однако ее роль в развитии НАЖБП не до конца ясна [2,3]. Лейкоциты периферической крови (ЛПК) являются основными клетками, реализующими иммунновоспалительные процессы в печени при патогенезе НАЖБП, однако данных по экспрессии днРНК в ЛПК пациентов НАЖБП практически нет в литературе. Данное обстоятельство, а также перспективность использования малоинвазивных маркеров для диагностики и прогнози-

рования НАЖБП, обуславливают актуальность изучения экспрессии днРНК в ЛПК пациентов с различными клинико-морфологическими формами НАЖБП.

Цель — сравнительный анализ уровней экспрессии днРНК *TUG1* в лейкоцитах периферической крови здоровых людей и пациентов с НАЖБП (стеатозом печени, НАСГ разной активности, циррозом печени).

Материалы и методы. Обследовано 106 больных с диагнозом НАЖБП, установленным впервые: 31 пациент со стеатозом печени (СП), 64 пациента с неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ) слабой (СА), умеренной (УА) и высокой (ВА) активности и 11 пациентов на стадии цирроза печени (ЦП). Контрольную группу составили 30 здоровых доноров. Уровень мРНК *TUG1* в ЛПК определяли методом ПЦР-РВ относительно гена 18S *rRNA*. Статистический анализ проведен с помощью языка статистического программирования и среды R (версия 4.3.1). Статистический анализ проведен с использованием критерия U Вилкоксона — Манна — Уитни. Проводили тест на соответствие результатов нормальному распределению. Значения $p < 0.05$ рассматривались как статистически значимые.

Результаты. Проведен анализ уровня экспрессии гена *TUG1* в ЛПК разных групп пациентов и здоровых доноров (Табл.).

ТАБЛИЦА. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *TUG1* У РАЗНЫХ ГРУПП ПАЦИЕНТОВ И В КОНТРОЛЕ

Контроль	СП	НАСГ-СА	НАСГ-УА	НАСГ-ВА	ЦП
2.94*10 ⁻⁵ ± 1.65*10 ⁻⁵ (1.08*10 ⁻⁵)	6.32*10 ⁻⁵ ± 2.33*10 ⁻⁵ (2.72*10 ⁻⁵)	2.47*10 ⁻⁴ ± 8.07*10 ⁻⁵ (1.33*10 ⁻⁴) *, Δ	3.84*10 ⁻⁴ ± 6.82*10 ⁻⁵ (3.55*10 ⁻⁴) *, Δ, #	1.064*10 ⁻³ ± 1.76*10 ⁻⁴ (1.11*10 ⁻³) *, Δ, #	1.24*10 ⁻³ ± 2.72*10 ⁻⁴ (1.35*10 ⁻³) *, Δ, #

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$. В скобках — медиана. $p < 0.05$ по сравнению с *контролем, Δс группой СП, #с группой НАСГ-СА, **с группой НАСГ-УА, Δс группой НАСГ-ВА (U критерий Манна-Уитни).

Обнаружено, что уровень экспрессии гена *TUG1* в ЛПК здоровых людей достоверно ниже, чем у больных НАСГ и НАЖБП на стадии ЦП. Уровни экспрессии *TUG1* в ЛПК здоровых людей и пациентов СП достоверно не различаются. Среди больных НАЖБП, пациенты со стеатозом печени имеют минимальный уровень экспрессии гена *TUG1* в ЛПК. Уровень экспрессии *TUG1* в ЛПК при НАСГ слабой активности выше, чем при СП, но ниже, чем при НАСГ умеренной и высокой активности и циррозе печени. При этом отличий уровня транскрипции *TUG1* между группами НАСГ-УА, НАСГ-ВА и ЦП не было обнаружено. Также выявлена тенденция повышения уровня мРНК *TUG1* в ЛПК при нарастании активности НАСГ, что указывает на возможность использования уровня экспрессии *TUG1* в ЛПК в качестве маркера разграничения СП и НАСГ-СА, а также маркера, указывающего на прогрессирование НАЖБП.

Заключение. Таким образом, получены новые данные по уровню экспрессии мРНК *TUG1* в ЛПК пациентов с НАЖБП, свидетельствующие о возможности использования уровня экспрессии *TUG1* в ЛПК в качестве малоинвазивного диагностического и прогностического маркера при НАЖБП.

Финансовая поддержка. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № FMEN-2022-0009 (№ гос. регистрации 122031100064-4) на оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра Карельский научный центр Российской академии наук.

Список литературы:

Лазебник Л.Б. и др. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых: клиника, диагностика, лечение. Рекомендации для терапевтов, третья версия. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2021;1(1):4-52. doi:10.31146/1682-8658-ecg-185-1-4-52

Lin Y.H. et. al. Taurine up-regulated gene 1 functions as a master regulator to coordinate glycolysis and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2018 Jan;67(1):188-203. doi: 10.1002/hep.29462

Han X, Hong Y, Zhang K. *TUG1* is involved in liver fibrosis and activation of HSCs by regulating miR-29b. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Sep 10;503(3):1394-1400. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.054

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ КАДГЕРИНОВ И ИНТЕГРИНОВ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Суходолова Т.А., Машкина Е.В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Нарушения репродуктивной функции — одна из самых актуальных проблем в современной биологии и медицине. Невынашивание беременности как мультифакториальное заболевание является результатом совместного действия многих факторов. Доля невынашивания из всего количества беременностей составляет 34,6% (Самигуллина и др., 2019). Наиболее неблагоприятным периодом по частоте самопроизвольного выкидыша (СПВ) считается срок до 12 недель. В это время происходит 80% всех самопроизвольных выкидышей (Wang et al., 2003). Следует отметить, что среди всех причин СПВ самый высокий процент составляют выкидыши в результате генетических аномалий (Полякова, 2021). Формирование межклеточных контактов (адгезия клеток), взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом играет важную роль на всех этапах репродуктивного цикла и осуществляется с участием молекул клеточной адгезии (МКА). Поэтому МКА

представляют интерес для исследований как возможные маркеры для прогноза протекания беременности.

Цель. Целью настоящего исследования явилось изучение взаимосвязи аллельных вариантов генов кадгерина (*CDH1*) и интегринов (*ITGA2*, *ITGB3*) с изменением риска невынашивания беременности в первом триместре.

Материал и методы. Материалом для исследования были образцы ДНК, выделенные из крови женщин с нормальным течением беременности и невынашиванием беременности (94 образца: 48 — контрольная группа, 23 — самопроизвольный аборт, 23 — неразвивающаяся беременность на сроке от 5 до 11 недель). Исследование аллельных вариантов генов проведено методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) для полиморфизмов rs16260 и rs5030625 гена *CDH1* и методом аллель-специфичной ПЦР для полиморфизмов 807C>T гена *ITGA2* и *Leu33Pro* гена *ITGB3*. Анализ межгенных

взаимодействий осуществлен при помощи метода уменьшения многофакторной размерности (MDR).

Основные результаты. В обеих исследуемых группах женщин преобладали гетерозиготы 807CT (контроль — 62,5%, невынашивание беременности — 50%) гена *ITGA2*, гомозиготы 33LeuLeu (56,25% и 75,6%) гена *ITGB3*, гомозиготы -160CC (58,7% и 47,91%) и -347GG (71,7% и 75%) гена *CDH1*. При сравнении частот аллелей выявлено статистически значимое отличие для полиморфизма *Leu33Pro* гена *ITGB3*. Частота аллели 33Pro в группе женщин с неразвивающейся беременностью составляет 0,07, что почти в 4 раза меньше по сравнению с контрольной группой, в которой частота составила 0,27 ($\chi^2 = 5,49$; $p = 0,02$; $OR = 0,2$, $CI 0,06-0,74$). При сравнении частот генотипов показано, что генотип 33LeuLeu в контрольной группе составляет 56,25%, в группе женщин с неразвивающейся беременностью — 86,37%. Можно отметить тенденцию к статистически значимым различиям в частотах генотипов ($p = 0,051$). При сравнении контрольной группы и группы женщин с самопроизвольным абортom статистически значимых отличий в частотах генотипов и аллелей не выявлено. Согласно результатам MDR-анализа, взаимодействие исследуемых полиморфных локусов генов МКА значимо для формирования риска невынашивания беременности ($\chi^2 = 22,88$; $p < 0,0001$; $OR = 12,14$, $CI 4,06-36,31$) и характеризуется эффектом синергизма. Наибольшее значение имеет взаимодействие локусов *ITGB3* и *CDH1*.

Интегрины и кадгеринy участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) — механизм раннего эмбрионального морфогенеза. Ряд последовательных ЭМП позволяет образоваться из зиготы множеству раз-

личающихся по свойствам тканей и органов. Нарушение механизмов ЭМП в различные сроки эмбриогенеза приводит к нарушениям эмбриогенеза, врожденным порокам развития или гибели эмбриона (Пучинская, 2015). Таким образом, продукты исследуемых генов могут совместно влиять на протекание беременности, играя важную роль в формировании тканей во время гаструляции, нейроляции, гисто- и органогенеза.

Выводы. Полиморфизмы генов *CDH1*, *ITGA2*, *ITGB3* могут оказывать совместное влияние на риск невынашивания беременности в первом триместре.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018

1. Wang X., Chen C., Wang I. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study//Fertil. Steril. Gynecology and Female Infertility. 2003. No. 3. p. 577-584.

2. Полякова Т. В. Анализ динамики самопроизвольных выкидышей в России // Актуальные исследования. 2021. №50 (77). С. 42-44. URL: <https://apni.ru/article/3434-analiz-dinamiki-samoproizvolnikh-vikidishej> (дата обращения: 09.02.2023)

3. Пучинская М.В. Эпителиально-мезенхимальный переход в норме и патологии. Архив патологии. 2015;77(1):75-83.

4. Самигуллина А.Э., Бообокова А.А., Кушубекова А.К. Невынашивание беременности: частота и тенденции// Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. Медицинские науки. 2019. No. 1. С. 87-92.

СИНДРОМ «СЕРДЦА АТЛЕТА» У МОЛОДЫХ СПОРТСМЕНОВ И ИЗОЛИРОВАННАЯ СИСТОЛИЧЕСКАЯ ГИПЕРТОНИЯ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МИНИМАЛЬНОГО НАБОРА ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ

Коломейчук С.Н.^{1,4}, Путилов А.А.², Мейгал А.Ю.³, Морозов А.В.¹, Зайцева И.А.¹, Воронин К.А.⁴, Межакова М.С.⁴, Марков А.А.⁴, Губин Д.Г.^{4,5}

¹ ФГБУН ФИЦ Карельский научный центр РАН, Петрозаводск, РФ;

² НИИ МББ, Новосибирск, РФ;

³ ФГБУ ВО ПетрГУ Минздрава России, Петрозаводск, РФ;

⁴ ФГБУ ВО ТюМГМУ Минздрава России, Тюмень, РФ

Введение. Изолированная систолическая гипертензия не является аномальным состоянием у молодых спортсменов мужского пола, в частности отражая развитие «сердца атлета» в ответ на высокие гемодинамические потребности. Последствия нарушений адаптации сердца к интенсивным тренировкам могут быть частично связаны с индивидуальными генетическими факторами спортсмена.

Методы. Была исследована выборка из 74 спортсменов и 24 мужчин контрольной группы. Спортсмены были набраны в три группы со следующими специализациями, ориентированных на силу (Ссл), скорость (Сск) и выносливость (Свн). Каждая из групп состояла из 24 или 25 участников исследования. В группу С-сл вошли тяжелоатлеты, пауэрлифтеры, метатели, боксеры и борцы. В группу С-ск

вошли бегуны на короткие и средние дистанции, а также футболисты. В группу С-вн вошли бегуны на длинные дистанции и лыжники. Все участники исследования имели европеоидное происхождение и были жителями Петрозаводска. Контрольные участники соответствующего возраста были здоровыми жителями одного города, не родственниками, без какого-либо спортивного опыта..

Все измерения и забор крови проводились в ходе планового медицинского осмотра. Обученные сотрудники проводили стандартизированные измерения систолического (САД) и диастолического артериального давления (ДАД) в 9:00 в состоянии покоя. Для определения состава тела применяли традиционный метод био импедансного анализа. Геномную ДНК выделяли из периферической крови с ис-

пользованием коммерческого набора для выделения ДНК «Синтол» («Синтол», Москва, Россия). Протокол исследования одобрен экспертным советом по этике ИБ КарНЦ РАН.

Результаты. Полученные частоты аллелей и генотипов для четырех потенциальных маркеров соответствовали частотам характерным для населения Восточной Европы и существенно не отличались от равновесия Харди-Вайнберга. При разделении атлетов на подгруппы с САД > 140 мм рт.ст. и САД < 140 мм рт.ст. распределение фенотипов с повышенным САД и без него показало достоверные различия группы С-сл по сравнению с группами С-ск и С-вн (5 и 2 с тренировкой против 20 и 47 без нее, $\chi^2 = 4,898$, $df = 1$, $p = 0,027$).

Полиморфные варианты изученных генов достоверно предсказывали САД и пульсовое АД (ПАД), но не ДАД. Линейный регрессионный анализ всей выборки спортсменов показал, что надежными предикторами более высоких значений САД были мажорные аллели полиморфных вариантов rs1815379 гена ACTN3 и rs945032 гена BDKRB2. Положительная ассоциация мажорных аллелей маркера rs1799752 гена ACE (D) и маркера rs4253778 гена PPARA (G) с более высоким САД и ПАД не имела статистически значимого уровня при анализе всей выборки, так и подвыборки спортсменов по специализации. Однако мажорный аллель маркера rs1799752 гена ACE оказался значимым предиктором САД в группе спортсменов в группе С-сл. Статистический анализ данных показал значимое взаимодействие между факторами аллель «ACE» и «Группа», мажорный аллель демонстрировал положительную связь с САД. Однако, эта связь в случае аллеля D полиморфного маркера rs1799752 ACE была значимой только в группе С-ск.

Для подтверждения связи риска повышенного САД с носительством мажорных аллелей четырех полиморфных

вариантов изучаемых генов, мы дополнительно рассчитали балл, суммирующий распространенность этих аллелей у каждого исследуемого спортсмена. Максимальный балл 8 был связан с 50% вероятностью систолического артериального давления > 140 мм рт. ст. Данный риск был невелик, поскольку такое сочетание четырех основных аллелей кажется очень редким. Однако такой риск стал намного выше в группе спортсменов, тренирующихся на профиль С-сл. А именно, тот же риск был связан в этой группе с довольно распространенной оценкой 6. Напротив, риск был незначительным для тех спортсменов, у которых количество основных аллелей ниже среднего (4 или меньше). Как показали результаты линейного регрессионного анализа более высокое значение САД, но не ДАД, достоверно предсказывало эту сумму. Связь суммы вариантов генов с САД или ПАД также была значимой у контрольной группы, но риск достижения значений САД > 140 мм рт. ст. при увеличении числа основных аллелей оставался на довольно низком уровне.

Выводы. Сумма основных аллелей четырех полиморфных вариантов генов предсказывала повышенное систолическое артериальное давление у спортсменов и нетренированной группы контроля. Только в группе спортсменов, специализирующихся на силовых тренировках, эта комбинация вариантов показывала риск повышения САД > 140 мм рт. ст. Установлено, что такая тренировочная специализация приводит к развитию специфических и в большинстве случаев невыгодных для жизнедеятельности особенностей развития сердца.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (темы FMEN-2022-0009 FMEN 2022-0003) и гранта Правительства Тюменской области Постановление от 20.11.2020 № 928-рп.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ СВЯЗИ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА RS5760489 ГЕНА GGT 1 И РИСКА РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Дроздова Е.Л., Солодилова М.А., Полоникова А.А.

Курский государственный медицинский университет (КГМУ), Курск, Россия

Актуальность. По данным статистики cerebrovasкулярные заболевания находятся в числе ведущих причин смертности и инвалидности в большинстве стран мира: отношение числа умерших к среднегодовой численности населения составляет более 16%, показатель преждевременно утраченных лет полноценной жизни — более 10% [3]. Наиболее распространенная форма среди острого нарушения мозгового кровообращения — инфаркт головного мозга, который составляет 80-85% случаев. Увеличение численности заболевших, частоты умерших от инфаркта мозга, и его последствий, высокий уровень инвалидизации (особенно лиц трудоспособного возраста) требуют как совершенствования и оптимизации имеющихся методов диагностики и лечения пациентов с одной стороны, так и разработки новых мероприятий, направленных на профилактику инфаркта мозга и его последствий с учетом всех факторов риска.

Важным звеном в цепи событий, приводящих к развитию инфаркта мозга, является нарушение редокс-гомеос-

таза, характеризующиеся избыточной продукцией активных форм кислорода и азота, и как результатом дефицитом антиоксидантов. В качестве основного механизма повреждения внутриклеточных сигнальных молекул, результатом которого являются cerebrovasкулярная дисфункция и прогрессирующая ишемия мозга метаболиту глутатиона в клетке. Облегчая трансмембранный транспорт веществ путем образования их гамма-глутамильных производных, ферментная система ГГТ регулирует поддержание внутриклеточного аминокислотного фонда, пептидный и белковый обмен в целом [1]. Выявление молекулярно-генетических аспектов метаболизма глутатиона у пациентов с риском острой ишемии мозга способствует созданию более полной системы первичной профилактики и лечения cerebrovasкулярных заболеваний.

А так же не вызывает сомнений тот факт, что прерывание ишемического каскада на более ранних этапах может сопровождаться большим эффектом от лечения [2].

Цель исследования — Изучить связь полиморфного варианта rs5760489 гена гамма-глутамилтрансферазы 1 (GGT1) с риском развития ишемического инсульта.

Материалы и методы. В исследовании участвовало 600 пациентов, находящихся на лечении в стационаре неврологического отделения Курской областной многопрофильной клинической больницы с подтвержденным диагнозом ишемический инсульт. В среднем, возраст пациентов составлял $61,09 \pm 9,77$ лет (из них 330 мужчин – 55% и 270 женщин – 45%). А так же были использованы образцы данных биобанка научно-исследовательского института генетической и молекулярной эпидемиологии КГМУ в количестве 688 человек без какой-либо соматической патологии, средний возраст которых — $60,84 \pm 7,45$ лет (366 мужчин и 322 женщины – 53,2% и 46,8% соответственно), которые использовались как контрольная группа исследования. Производился забор цельной венозной

крови. Для выделения ДНК из образцов крови использовался стандартный двухэтапный метод фенольно-хлороформной экстракции и преципитации этанолом.

Для опроса применялась анкета по изучению инсультов, разработанная на кафедре биологии, медицинской генетики и экологии КГМУ.

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с помощью программы Statistica 8.0 фирмы StatSoft Inc и MS Excel.

Результаты исследования. Проведен анализ кодоминантной модели ассоциаций полиморфного варианта rs5760489 гена GGT1 с риском развития ишемического инсульта в общих группах и в группах, стратифицированных по полу, данные представлены в таблице 1. Для изученного полиморфизма rs5760489 частоты генотипов соответствовали их ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга (то есть $p > 0,05$).

ТАБЛИЦА 1. АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА RS5760489 ГЕНА GGT1 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА В ОБЩИХ ГРУППАХ И В ГРУППАХ, СТРАТИФИЦИРОВАННЫХ ПО ПОЛУ

Генотип, аллель	Контроль, n=688 n (%)	Больные ИИ, n=600 n (%)	OR (95% CI)	P-value
Общие группы				
A/A	402 (59,9)	306 (55,1)		0,61
A/G	237 (35,3)	225 (40,5)	1,25(0,99-0,58)	
G/G	32 (4,8)	24 (4,3)	0,99(0,57-1,71)	
A	0,776	0,754	1,13(0,94-1,36)	0,225
Мужчины				
A/A	201 (56,5%)	164 (54%)		0,83
A/G	137 (38,5%)	124 (40,8%)	1,10(0,80-1,52)	
G/G	18 (5,1%)	16 (5,3%)	1,08(0,53-2,18)	
A	0,754	0,743	1,09 (0,85-1,40)	0,55
Женщины				
A/A	201 (63,8%)	142 (56,6%)		0,12
A/G	100 (31,8%)	101 (40,2%)	1,41 (0,99-2,01)	
G/G	14 (4,4%)	8 (3,2%)	0,81 (0,33-1,98)	
A	0,767	0,797	1,19(0,90-1,58)	0,25

Выводы. В результате анализа полученных данных ни один из изученных генотипов полиморфного локуса rs5760489 гена GGT1 не ассоциировался с риском развития инфаркта мозга.

Пол-специфические эффекты, исследуемого полиморфизма rs5760489 гена GGT1 на риск возникновения ишемического инсульта, не были выявлены.

Список литературы:

1. Азарова Ю.Э., Клёсова Е.Ю., Чурилин М.И., и др. Генетико-биохимическое исследование роли гамма-глутамилциклотрансферазы в формировании предрасполо-

женности к сахарному диабету 2-го типа // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 215–228. <https://doi.org/10.17816/ecogen16293>.

2. АПОПТОЗ И АУТОФАГИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) / Луговая А.В., Эмануэль В.С., Калинина Н.М., Иванов А.М., Артемова А.В. // Клиническая лабораторная диагностика. — 2020. — Т. 65., № 7. — С. 428-434.

3. Вострикова К. В. Головные боли, связанные с ишемическим инсультом и транзиторной ишемической атакой/ К. В. Вострикова // Вселенная мозга. — 2021. — Т. 3, № 1(8). — С. 8-10. — EDN OTCCFW.

ТРАНСКРИПТОМИКА И ГЕНОМИКА ПРЕЭКЛАМПСИИ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

Трифенова Е.А., Зарубин А.И., Бабовская А.А., Степанов В.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ), Томск, Россия

Введение. Анализ генома и транскриптома различных тканей и клеток, а также регуляторных механизмов экспрессии генов представляет значительный интерес для исследователей, поскольку нарушение транскрипционной активности генов вовлечено в патогенез многочисленных заболеваний. На сегодняшний день омиксные технологии нашли широкое применение во всевозможных областях предиктивной медицины, к примеру, в разработке методов диагностики, стратегии прогнозирования и профилактики различных заболеваний, включая и акушерскую патологию, где в качестве одного из основных объектов изучения выступает плацента. Необходимо отметить, что изучение молекулярных процессов, происходящих в плацентарной ткани и связанных с транскрипционной регуляцией генной экспрессии, рассматривается на сегодняшний день как наиболее перспективное направление для раскрытия патофизиологии осложненного течения беременности, и в частности такого тяжелого заболевания как преэклампсия (ПЭ).

Цель и задачи. Охарактеризовать паттерны транскриптома плацентарной ткани и ее отдельных субпопуляций клеток, специфичные для женщин с ПЭ и физиологическим течением беременности и оценить роль полиморфных маркеров генов, дифференциально экспрессирующихся при патологической и нормальной беременности, в формировании структуры предрасположенности к ПЭ.

Материалы и методы. Полногеномный анализ экспрессионных профилей 24 образцов дистальной части плацентарной ткани пациенток с ПЭ и женщин с физиологической беременностью (ФБ) выполнен с помощью технологии микрочипов (HT-12 BeadChip v.4, Illumina). Единичные децидуальные клетки (ДК) и клетки синцитиотрофобласта (СТБ) были получены с помощью технологии лазерной микродиссекции («Laser Capture Microdissection») препаратов тонких окрашенных срезов. Тотальная РНК 1000 изолированных ДК и клеток СТБ была выделена набором Single Cell RNA Purification Kit (Norgen). Синтез библиотек для полнотранскриптомного анализа проводился набором SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 (Takara). Готовые библиотеки объединяли в пул и секвенировали на платформе Illumina Next-seq 500. Для поиска дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) был использован метод обобщенных линейных моделей (GLM) программного пакета limma. Функциональный анализ кластера ДЭГ, проводили с помощью веб-инструмента Molecular Signatures Database (MSigDB). Конструирование генных сетей проводили с использованием программы STRING 9.0.

Суммарный объем выборки для анализа вариабельности ДНК, включенной в исследование, составил более 1000 женщин, которые согласно течению и исходам беременности были разделены на группу больных с ПЭ (N=721 чел.) и контрольную группу (N=552 чел.). Генотипирование

полиморфных маркеров (tagSNPs) ДЭГ осуществляли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Для сравнения частот аллелей и генотипов между анализируемыми группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса или двусторонний точный тест Фишера.

Основные результаты. В плацентарной ткани обнаружено 63 гена, статистически значимо дифференциально экспрессирующихся между пациентками с ПЭ и физиологической беременностью. Функциональная аннотация ДЭГ свидетельствует о ряде биологических процессов, играющих важную роль в молекулярном патогенезе ПЭ: реакции, связанные с иммунным ответом, межклеточным взаимодействием, регуляция апоптоза и др. Анализ метаболических путей, в которые включены ДЭГ, указывает на возможное участие в патофизиологических механизмах ПЭ путей цитотоксичности, обусловленной НК-клетками, трансэндотелиальной миграции лейкоцитов и сигнальных путей, опосредованных активаторами GTP-аз. Полученная с помощью базы данных «STRING» сеть белок-белковых взаимодействий подтверждает взаимосвязи между генами, выявленные при исследовании биологических путей и процессов. Интеграция данных функциональной аннотации ДЭГ и анализа сетевых взаимодействий белков, кодируемых этими генами, позволила выделить кластер наиболее значимых ДЭГ, наследственная вариабельность которых была изучена на геномном уровне.

Так, сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов 85 полиморфных маркеров (tagSNPs) данных ДЭГ между пациентками с ПЭ и женщинами с ФБ выявил ассоциацию с развитием ПЭ 27 полиморфных вариантов следующих генов: *ANKRD37*, *BHLHE40*, *CORO2A*, *GPT2*, *HK2*, *INHA*, *LEP*, *LHB*, *NDRG1*, *PLIN2*, *PPP1R12C*, *SASH1*, *SIGLEC6*, *SYDE1* и *ZNF175*. Необходимо отметить, что большинство ассоциированных с ПЭ tagSNPs согласно результатам анализа с использованием онлайн ресурсов HaploReg и RegulomeDB были локализованы в сайтах связывания транскрипционных факторов и имели высокий регуляторный потенциал. Данное наблюдение представляет особый интерес в контексте результатов, полученных в ряде недавних работ, демонстрирующих важную роль регуляторных участков плацентарных генов как в развитии осложненного течения беременности, так и в отношении предрасположенности к множественным постнатальным заболеваниям человека. Тем не менее, стоит отметить, что, исходя из современных представлений о крайне гетерогенном клеточном составе плаценты высоко актуальны исследования по картированию генетических вариантов, определяющих экспрессию генов в различных типах клеток плаценты при нормальной и патологической беременности.

Так, в результате проведенного нами анализа транскриптома на уровне отдельных субпопуляций клеток плацентарной ткани выявлены 26 генов, экспрессия которых статистически значимо различается в клетках СТБ женщин с

ПЭ и физиологическим течением беременности, и 35 ДЭГ обнаружено для ДК. Кластер ДЭГ содержит не только известные гены-кандидаты, выявленные ранее во многих зарубежных полногеномных исследованиях плаценты (к примеру, *LEP*, *INHBA* и *FLT1*), но и новые гены (*AC098613.1*, *AC087857.1*, *FCRLB*, *TENM4*, *PTP4A1P7*, *LINC01225* и др.), которые могут рассматриваться в качестве новых биологических маркеров ПЭ и представляют интерес для дальнейшего изучения. Результаты функциональной аннотации ДЭГ показывают, что с развитием ПЭ на уровне СТБ могут быть связаны сигнальные пути регуляции гормональной секреции, MAPK-каскада, ERK1 и ERK2 каскада, положительной регуляция клеточной адгезии и пролиферации эндотелиальных клеток. Наряду с этим, биологические процессы, задействованные в молекулярный

патогенез ПЭ на уровне ДК связаны с синтезом гамма-аминомасляной кислоты и развитием оксидативного стресса.

Заключение. Таким образом, в представленной работе обнаружены новые генетические маркеры ПЭ и показана значимая роль регуляторных участков генома человека в подверженности к данной патологии. На примере ПЭ апробирован системный подход к поиску перспективных биомаркеров гестационных осложнений, основанный на комбинации геномных, транскриптомных и биоинформатических методов. Это исследование расширяет представление о задействованных в ПЭ молекулярных механизмах и может служить основой для разработки профилактических, прогностических и терапевтических стратегий в области персонифицированного акушерства.

ЭКСПРЕССИЯ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК MALAT1, GAS5, TUG1 ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Топчиева Л.В.^{1*}, Корнева В.А.²

¹ ФГБУН Федеральный исследовательский центр КарНЦ РАН

² ФГБОУВО Петрозаводский государственный университет

*Topchieva67@mail.ru

Введение. В эпигенетической регуляции уровня давления крови участвуют длинные некодирующие РНК (днРНК). Нарушение их экспрессии связано с риском сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе и артериальной гипертензии (АГ). Таким образом, днРНК могут выступать как терапевтические мишени, а их уровень служить в качестве биомаркера АГ. В модулировании пролиферации, гибели эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов участвуют днРНК MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), GAS5 (growth arrest-specific transcript 5), TUG1 (taurine upregulated gene 1).

Цель исследования — изучить уровень транскриптов днРНК MALAT1, GAS5, TUG1 при артериальной гипертензии.

Материалы и методы. В исследование включены условно здоровые люди (24 человека, возраст $46,90 \pm 2,26$ лет) и пациенты с диагнозом артериальная гипертензия (I-II стадии) до назначения гипотензивных препаратов (12 че-

ловек, возраст $45,56 \pm 5,51$ лет) и принимающие более года метопролол (25 мг/сут) или бисопролол (5-10 мг/сут) (20 человек, возраст $51,90 \pm 3,88$ год). Уровень транскриптов днРНК в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) изучали методом ПЦР в режиме реального времени.

Основные результаты. Уровень днРНК MALAT1 оказался выше в ЛПК пациентов с АГ без гипотензивной терапии, чем в ЛПК условно здоровых людей и больных, принимающих метопролол или бисопролол ($p=0,003$ и $p=0,005$, соответственно) (таблица). Содержание транскриптов GAS5 было ниже в ЛПК пациентов с АГ до назначения гипотензивных препаратов, чем индивидов из контрольной группы ($p=0,0008$) (таблица). Количество транскриптов GAS5 в ЛПК условно здоровых людей и пациентов, принимающих метопролол или бисопролол не отличался ($p=0,65$) (таблица). Уровень экспрессии днРНК TUG1 в ЛПК индивидов из всех групп исследования был практически одинаковым ($p>0,05$) (таблица).

ТАБЛИЦА. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ДНРНК В ЛПК УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С АГ

днРНК	Группы исследования		
	Условно здоровые люди	Пациенты с АГ без терапии	Пациенты с АГ на терапии
MALAT1	0,029	0,800 ^{a,b}	0,035 ^b
GAS5	0,600	0,040 ^{a,b}	0,800 ^b
TUG1	0,010	0,01	0,05

Примечание. Данные представлены в виде медианы. ^aРазличия значимы при сравнении групп условно здоровых людей и пациентов с АГ без терапии. ^bРазличия значимы при сравнении групп пациентов с АГ без гипотензивной терапии и пациентов с АГ, принимающих кардиоселективные блокаторы β -адренорецепторов.

Выводы. Формирование АГ сопровождается изменением уровня экспрессии днРНК MALAT1 и GAS5. Прием пациентов с АГ метопролола или бисопролола, вероятно, способствует нормализации уровня экспрессии этих днРНК.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0009).

ПРЕДИКТИВНЫЕ АСПЕКТЫ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА VDR ПРИ РАЗВИТИИ ОСЛОЖНЕНИЙ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ У БОЛЬНЫХ НА ФОНЕ ПРИЕМА СТАТИНОВ

Коваленко А.В., Никитина В.В.

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им В.И. Разумовского Минздрава России», Саратов, Россия

Актуальность. В последние десять лет, по данным зарубежной литературы, проводятся исследования, посвященные изучению ассоциации того или иного генного полиморфизма с мочекаменной болезнью почек (МКБ). Часть работ показывает наличие связи исследуемого гена с МКБ. Наибольший интерес исследователей во всем мире проявляется к изучению ассоциаций МКБ с разными аллелями генов, участвующих в регуляции обмена витамина D [1-4] и к исследованию роли полиморфизма гена, кодирующего рецептор к кальцию-CASR [5-8]. Ген VDR (рецептор витамина D) кодирует рецептор, который связывает витамин D3 (кальцитриол) и регулирует активность генов минерального обмена и секрецию паразитовидного гормона, контролируя, таким образом, гомеостаз кальция и фосфора. Этот рецептор также функционирует в качестве рецепторов для вторичной желчной кислоты — литохолевой кислоты.

Ген VDR широко представлен в организме, причем не только в классических органах-мишенях, таких как кишечник, почки и кости, но и в мозге, сердце, эндотелии сосудов, гладкомышечных клетках, поджелудочной, предстательной и паразитовидной железах, коже и других органах.

Широкое распространение VDR в тканях предполагает, что данная система помимо кальциевого гомеостаза, имеет дополнительные физиологические функции. Действительно, было показано, что витамин D и его активные метаболиты играют важную роль в иммунной, сердечно-сосудистой, репродуктивной системах, в углеводном обмене, росте волос, а также тормозят пролиферацию кератиноцитов кожи и активируют их дифференцировку, предотвращают развитие различных опухолей. В настоящее время доказана роль рецептора витамина D в патогенезе и особенностях течения артериальной гипертензии.

Для гена VDR характерен генетический полиморфизм. Установлена связь полиморфизма гена VDR с такими заболеваниями, как хроническая почечная недостаточность, уролитиаз, почечной остеодистрофией, остеопороз, гиперпаратиреоз, синдром раздраженной толстой кишки, опухолевыми заболеваниями, заболеваниями пародонта, а также различными сердечно-сосудистыми заболеваниями.

В лечении атеросклероза, на сегодняшний день, значительная часть отводится применению статинов. В последние годы все чаще появляются сведения об отрицательном биохимическом воздействии этих препаратов на органы и системы человека. Наибольшему риску при приеме статинов подвергаются пациенты уже с имеющейся патологией печени и почек. Поражение почек может быть обусловлено как прямым токсическим эффектом медикаментов, так и опосредованным через иммунопатологические реакции [9].

В современных условиях актуальное значение приобретают вопросы безопасности назначения статинов, что обуславливает проведение дополнительных исследований.

Цель исследования: диагностика и профилактика почечных осложнений воспалительного и дисметаболического генеза при назначении статинов, с учетом полиморфизма гена VDR:283 A>G BsmI.

Материалы и методы: проанализированы результаты обследования 18 человек, из которых 13 имели в анамнезе уролитиаз (остальные 5 составили контрольную группу).

Для определения генетического полиморфизма 283 A>G (BsmI) гена VDR использовалась периферическая кровь, взятая натощак с антикоагулянтом ЭДТА. Исследование проводилось методом ПЦР в режиме реального времени в лабораторной службе «Helix» г. Саратова.

Сравнение контрольных и опытных частот проводилось с помощью критерия χ^2 на независимость при условии, что все значения частот сравниваемых признаков больше 5. При частотах меньше 5 сравнение проводилось с использованием точного критерия Фишера. Использовались непараметрические методы: критерий Манна-Уитни для независимых выборок и критерий Вилкоксона для оценки изменения показателей внутри групп.

Основные результаты: анализ частот аллелей полиморфизма 283 A>G (BsmI) гена VDR показал, что в группе с уролитиазом реже встречался аллель A (26%), тогда как регистрация аллеля G, наоборот, была повышена (74%). Гетерозиготный генотип A/G гена VDR:283 A>G BsmI определялся в 54,0% случаев, гомозиготный G/G генотип — в 46,0%. Генотип A/A выявлен не был.

В контрольной группе чаще встречался аллель A (54%). Гетерозиготный генотип A/G гена VDR:283 A>G BsmI определялся в 40,0% случаев, гомозиготный генотип A/A — 40,0% и G/G — в 20,0% случаев.

Заключение: по данным работы, клинически значимым, стало выявление аллеля G гена VDR:283 у больных с уролитиазом на фоне приема статинов. Частота встречаемости аллеля G гена VDR:283 может быть ассоциирована с мочекаменной болезнью, и являться генетическим фактором риска.

Список литературы.

1. Wang S, Wang X, Wu J. Association of vitamin D receptor gene polymorphism and calcium urolithiasis in the Chinese Han population. // Urol Res. 2012. Vol. 40, N 4. P. 277-284.
2. Lin Y, Mao Q, Zheng X. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and the risk of urolithiasis: a meta-analysis. // Urol internat. 2011. Vol.86. P. 249-255.
3. Seo IY, Kang IH, Chae SC, Park SC, Lee YJ, Yang YS, Ryu SB, Rim JS. Vitamin D receptor gene Alw I, Fok I, Apa I, Taq I Seo polymorphisms in patients with urinary stone. // Urol. 2010. Vol. 75, N 4. P. 923-929.
4. Ferreira L, Pereira A, Heilberg I. Vitamin D receptor and calcium-sensing receptor gene polymorphisms in

hypercalciuric stone-forming patients. // *Nephron Clin Pract.* 2010. Vol. 114, N 2. P. 135-144.

5. Shakhssalim N, Kazemi B, Basiri A. Association between calcium-sensing receptor gene polymorphisms and recurrent calcium kidney stone disease: a comprehensive gene analysis. // *Scand J Urol Nephrol.* 2010. Vol. 44. P. 406-411.

6. Chou YH, Woon PY, Chen WC. A genetic polymorphism (rs17251221) in the calcium-sensing receptor gene (CASR) is associated with stone multiplicity in calcium nephrolithiasis. // *Publ Library Science One (USA).* 2011. Vol. 6, N 9. P. 1-9.

7. Vezzoli G, Scillitani A, Corbetta S. Polymorphisms at the regulatory regions of the CASR gene influence stone risk in primary hyperparathyroidism. // *Eur J Endocrin.* 2011. Vol. 164. P. 421-427.

8. Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T. Calcium kidney stones are associated with a haplotype of the calcium-sensing receptor gene regulatory region. // *Nephrol. Dial Transplant.* 2010. Vol. 25. P. 2245-2252.

9. Родненкова О.С. Плейотропные биохимические эффекты статинов и возможности их коррекции. 2006. Дисс. к. мед. наук.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *VDR* В ЛОКАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ-КУЗБАССА

Имекина Д.О., Тхоренко Б.А., Мейер А.В., Ульянова М.В., Лавряшина М.Б.

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, Кемерово, Россия

Введение. Выявление факторов риска является одной из ключевых задач в профилактике и лечении многофакторных заболеваний. Одним из перспективных направлений поиска новых омикс-биомаркеров является изучение системы витамина D. Роль витамина D в организме не ограничивается регуляцией гомеостаза кальция и фосфора, появляются все новые исследования о иммуномодулирующих, нейротропных, противоопухолевых свойствах, а также выявляют новые ассоциации с такими заболеваниями, как туберкулез, диабет, сердечно-сосудистые и многие другие заболевания. Эффекты витамина D осуществляются посредством геномных и негеномных механизмов. Геномные механизмы опосредованы взаимодействиями рецептора витамина D (vitamin D receptor) с геномной ДНК. Негеномные механизмы обеспечивают быстрый клеточный ответ через связывание с мембранным, ядерным VDR и межбелковыми взаимодействиями. Отдельно стоит отметить селективную значимость полиморфизма генов системы витамина D и их роль в адаптации популяций к среде обитания. Комплексный анализ всех возможных эффектов витамина D позволит сформировать целостную картину причин, специфики и характера распространенности заболеваний, в основе которых лежит модификация VDR-сигналинга.

Целью исследования стало изучение полиморфных вариантов гена *VDR* rs1544410 (BsmI), rs731236 (TaqI), rs7975232 (ApaI), rs2228570 (FokI), rs3847987, rs7968585 в группах шорцев и русских Кемеровской области-Кузбасса.

Материалы и методы. Для исследования полиморфных вариантов гена *VDR* с точки зрения потенциального инструмента для диагностики многофакторных заболеваний использовался популяционно-генетический метод, позволяющий изучить закономерности распространения частот в разных популяциях и прогнозировать их частоту в последующих поколениях. Исследован генофонд русских (N=100) и шорцев (N=96) Кемеровской области-Кузбасса. Материалом для исследования послужила геномная ДНК,

выделенная из образцов венозной крови. Биологические материалы коренного населения Кемеровской области-Кузбасса были привлечены из биоресурсной коллекции кафедры молекулярной и клеточной биологии ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава РФ. Данная коллекция собрана в результате экспедиционного обследования населения области и включает образцы ДНК шорцев из всех мест их компактного расселения в Кемеровской области-Кузбассе. Биологические образцы были получены в сопровождении анкеты участника и информированного согласия на участие в обследовании. Для каждого из обследованных составлялась родословная на три поколения, и в выборку включаются лишь те индивиды, которые по всем линиям родства относятся к данному народу и были рождены в пределах изучаемого района (популяции). Биологические материалы русских Кемеровской области-Кузбасса предоставлены ГКУЗ Кузбасским центром крови. Основными критериями включения в данную группу были национальность (со слов на основе опроса) и отсутствие острых и хронических заболеваний (по данным медицинского анамнеза).

Из коллекций образцов геномную ДНК выделяли при помощи метода фенол-хлороформной экстракции. Проведено измерение эффективной концентрации ДНК. Генотипирование по панели ДНК-маркеров гена *VDR* rs1544410 (BsmI), rs731236 (TaqI), rs7975232 (ApaI), rs2228570 (FokI), rs3847987, rs7968585 осуществляли с использованием метода ПЦР в режиме реального времени с применением наборов ООО «ДНК-Синтез» (г. Москва). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ StatSoft Statistica 8.0 и стандартных алгоритмов популяционной генетики. Для исследованных групп были рассчитаны аллельные частоты, ожидаемые генотипы, показатели наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности.

Результаты и их обсуждение. Рецептор витамина D (*VDR*) благодаря геномному действию и не геномным эффектам способен модулировать адаптационный потенциал в условиях динамического воздействия биотических и абиотиче-

ских факторов окружающей среды как на индивидуальном, так и на популяционном уровне, тем самым является перспективным для поиска новых омикс-маркеров для выявления и ранней диагностики многофакторных заболеваний.

Исследование частоты генотипов полиморфных вариантов гена *VDR* rs1544410, rs731236, rs7975232, rs2228570, rs3847987, rs7968585 и анализ состояния равновесия у русских и шорцев Кемеровской области-Кузбасса выявили достоверное отклонение от состояния равновесия (з-н Харди-Вайнберга) генотипических частот в группе русских только по частотам rs3847987 в сторону снижения уровня гетерозиготности, в группе шорцев отклонение от состояния равновесия зафиксировано по частотам трех полиморфных вариантов — rs7968585, rs3847987 и rs7975232. Направление отклонения различно. По rs7968585 и rs7975232 показано снижение гетерозигот, а по rs3847987 — увеличение. Вычисление усредненных значений показало в целом общую для коренного и пришлого населения региона тенденцию к снижению показателей гетерозиготности, однако в выборке шорцев выраженность этого процесса оказалась в 2,5 раза выше.

Сравнительный анализ частот аллелей полиморфных вариантов гена *VDR* в популяции шорцев и русских выявил статистически значимые отличия ($p < 0,05$) по трем полиморфным вариантам — rs7968585 (Apol), rs731236 (Taql) и rs3847987. У шорцев, по этому комплексу, частоты аллеля «дикого типа» оказались ниже (0,390, 0,541, 0,773 соответственно), чем у русских (0,591, 0,729, 0,899). Однако интерпретация выявленного факта вызывает затруднение. Анализ данных литературы позволяет утверждать, что несмотря на широко исследованность данных полиморфных вариантов

в отношении ассоциаций с патологическими состояниями и статусом витамина D, данных о влиянии этих мутационных событий на экспрессию самого гена и синтез, кодируемого им продукта, в доступной опубликованной литературе нет. Решение этого вопроса требует дополнительных исследований с применением подходов функциональной геномики.

Выводы. Результаты исследования выявляют специфику популяционно-генетической структуры коренного (шорцы) и пришлого (русские) населения Сибири. Однако, учитывая многообразие генетического контроля статуса витамина D и, следовательно, *VDR*-сигналинга, для полноценной интерпретации полученных данных необходимо провести дополнительные исследования на более крупных выборках с использованием более широкой панели генов. Результатом такой работы будет получение сведений о этнических и региональных частотах гаплотипов и гаплогенотипов, которые позволят улучшить понимание патофизиологических процессов течения многофакторных заболеваний и закономерностей их распространенности в популяциях отдельных территорий, а также послужат эффективным инструментом для разработки молекулярно-генетических диагностических маркеров раннего выявления многофакторных заболеваний.

Исследование проведено в соответствии с Хельсинской декларацией под контролем локального этического комитета ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава РФ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материал подготовлен за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-25-20209, <https://rscf.ru/project/22-25-20209> и Министерства науки и высшего образования Кузбасса.

РОЛЬ ЦИРКАДИАНЫХ ФАКТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

Коломейчук С.Н.^{1,2}, Коростовцева Л.С.², Кемстач В.В.², Осипенко С.И.², Бочкарев М.В.², Шадрунова В.В.², Заброта Е.А.², Железняков В.С.², Мокин Е.Н.², Свириев Ю.В.²

¹ ФГБУН Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ Карельский научный центр РАН, Петрозаводск, РФ;

² ФГБУ НМИЦ им. В.А.Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, РФ

Актуальность. Острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) считается одной из важнейших проблем современной медицины. Это обусловлено высокой медицинской и социальной значимостью ОНМК, так как оно неизбежно ведет к тяжелым медицинским, экономическим и социальным последствиям как для самих пациентов и их родственников, так и для общества в целом, что делает необходимым формирование комплексных лечебных и нейрореабилитационных программ в ранние сроки после развития ОНМК. Согласно выдвинутой гипотезе, циркадианные факторы принимают участие в восстановлении при ишемическом инсульте за счет сон-опосредованной регуляции синаптической пластичности.

Целью работы является поиск ассоциаций циркадианных факторов с исходами инсульта.

Методы. Проводили скрининг пациентов, поступив-

ших с подозрением на острый инсульт в отделение нейрореанимации, отобраны пациенты с диагнозом ОНМК по ишемическому типу, с подтверждением диагноза по данным КТ/МРТ головного мозга. Исследование было одобрено этическим ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, выписка 1612-21-02 из протокола заседания ЛЭК №12-21-02 от 20.12.2021 г. и выполнено в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации ВМА. Образцы крови брали между 08:00 и 09:00 ч утра. ДНК выделяли из 100 мкл периферической крови пациентов с помощью набора DiaGene для выделения геномной ДНК («Диа-М») согласно инструкциям производителя. Генотипирование по полиморфным маркерам генов *CLOCK* (rs1801260) и *PER3 VNTR* (rs57875989) выполняли с помощью ПЦР с аллель-специфическими праймерами компании «Синтол». Для проведения амплификации использо-

вали программируемый термоциклер Q5 (Bio-Rad, США). Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.0 с использованием непараметрического критерия Крускала—Уоллиса и ANOVA.

Результаты. Выполнен скрининг пациентов, поступивших с подозрением на острый инсульт в отделение нейрореанимации, отобрано 284 пациента с диагнозом ОНМК по ишемическому типу, у 181 пациента диагноз подтвержден по данным КТ/МРТ головного мозга. Возраст испытуемых — 62 года [55,0;71,0]. Тип ОНМК по критериям TOAST: вследствие атеросклероза крупных артерий — 10,6%, кардиоэмболический — 31,9%, лакунарный — 29,8%, другой установленной этиологии — 23,4%, неустановленной этиологии — 4,3%. Проведен предварительный анализ части образцов (n=149) с оценкой полиморфных вариантов генов ренин-ангиотензиновой системы (ген ACE) и циркадных генов (гены PER3 и маркер гена CLOCK rs1801260) и их взаимосвязи с показателями сна, характеристиками инсульта и функциональными исходами ишемического инсульта. Валидный результат, пригодный для дальнейшего анализа, получен: для гена PER3 для 115 пациентов, для гена CLOCK для 112 пациентов. Распределение генотипов: ген PER3 (variable number tandem repeat, VNTR): 4/4 — 45 (39,1%), 4/5 — 57 (49,6%), 5/5 — 13 (11,3%). маркер CLOCK rs1801260: генотип ТТ — у 45 (41,1%), ТС — у 54 (48,2%), СС — 12 (10,7%). Среди лиц с генотипом PER3 4/4 чаще регистрировался ишемический инсульт неустановленной этиологии (61,9%), среди лиц с генотипом PER3 4/5 — кардиоэмболический (32,7%) и инсульт неустановленной этиологии (32,7%), а среди лиц с генотипом PER3 5/5 — кардиоэмболический инсульт (41,7%) ($p=0,007$). Среди носителей полиморфного маркера гена CLOCK rs1801260 ($p=0,73$) не выявлено различий в частоте распределения типов инсульта по классификации TOAST. Различные типы инсульта по классификации TOAST встречались с одинаковой частотой у лиц с утрен-

ним, вечерним и неопределенным хронотипом ($p=0,40$). Носители разных генотипов гена CLOCK (маркер гена CLOCK rs1801260) различались по выраженности функционального дефицита в остром периоде ишемического инсульта как при поступлении, так и на момент выписки. Наиболее выраженный неврологический дефицит по шкале NIHSS при поступлении отмечался у гомозигот по аллелю Т: 6 (0;31) баллов против 3,5 (0;25) для гетерозигот (ТС) и 4,5 (2;19) для гомозигот по аллелю С ($p<0,001$). У гомозигот по аллелю Т отмечалась наиболее выраженная динамика с обратным развитием симптомов ($p=0,008$). У гомозигот гена CLOCK зарегистрированы более низкие показатели по шкале Barthel, по сравнению с гетерозиготами: ТТ — 50 (0;100) баллов, СС 50 (0;75) и ТС 70 (5;100) баллов ($p=0,020$), а также более выраженная положительная динамика к моменту выписки ($p=0,009$). По индексу мобильности Rivermid различий не было ни на момент поступления ($p=0,56$), ни при выписке ($p=0,66$). Между носителями различных генотипов гена PER3 не выявлено различий в функциональных исходах, как и в зависимости от хронотипа. Установлены слабые связи между выраженностью функционального дефицита по шкале NIHSS при поступлении и маркера гена CLOCK rs1801260 ($\rho=-0,23$, $p=0,016$), по шкале NIHSS при выписке и генотипом гена CLOCK (маркер гена CLOCK rs1801260) ($\rho=-0,22$, $p=0,045$).

Выводы. Среди пациентов-носителей минорной аллели 5 полиморфного маркера VNTR гена PER3 чаще диагностировали кардиоэмболический инсульт. Среди носителей разных полиморфного маркера гена CLOCK rs1801260 не выявлено различий в частоте распределения типов инсульта. Наиболее выраженный неврологический дефицит по шкале тяжести инсульта при поступлении отмечен у гомозигот по аллелю Т полиморфного маркера гена CLOCK rs1801260.

Работа поддержана грантом РФФ 21-75-10173.

ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМА RS174583 ГЕНА FADS2 У ПАЦИЕНТОВ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И ОЖИРЕНИЕМ, ПРОЖИВАЮЩИХ В МОСКОВСКОМ РЕГИОНЕ

Пилипенко В.В.¹, Шарифетдинов Х.Х.^{1,2,3}, Плотникова О.А.¹, Алексеева Р.И.¹, Сорокина Е.Ю.¹

¹ ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, Россия

² ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГАУ ВО «Первый московский медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Актуальность: генетические вариации в кластере генов FADS, в том числе rs174583, могут вызывать изменения в уровнях жирных кислот и десатуразы в плазме, что может дать новое понимание диагностических и терапевтических стратегий для пациентов сахарным диабетом (СД) 2 типа и ожирением.

Цель: выявить частоту встречаемости полиморфизма rs174583 гена FADS2 у больных сахарным диабетом (СД) 2

типа и ожирением, проживающих в Московском регионе.

Материал и методы: в исследовании принимали участие 76 пациентов, из них 48 пациентов с СД 2 типа и ожирением II-III степени и 28 пациентов с ожирением II-III степени без сопутствующего СД, в возрасте от 19 до 70 лет (средний возраст 55,8±13,2 лет). Продолжительность заболевания СД 2 типа в выборке обследованных пациентов составила в среднем 9,0±1,8 лет. На момент пер-вич-

ного обследования у включенных в исследование пациентов СД 2 типа уровень базальной гликемии составил $6,9 \pm 0,36$ ммоль/л, гликированного гемоглобина HbA1c — $6,2 \pm 0,18\%$. У пациентов с ожирением уровень базальной гликемии составил $5,0 \pm 0,12$ ммоль/л.

Выделение ДНК проводилось на автоматической станции ermotion 5075 фирмы Eppendorf, Германия. Генотипирование проведено с применением аллель-специфичной амплификации с детекцией результатов в режиме реального времени и использованием taqman-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК, реагентов ("Синтол", Россия) и амплификатора "CFX96 Real Time System" ("Bio-Rad", США).

Результаты: Мутантный аллель Т встречался у 65,7% пациентов, принимавших участие в исследовании, у 24,0%

из них встречался гомозиготный генотип ТТ. Гомозиготный генотип СС полиморфизма rs174583 гена FADS2 выявлен у 35,4% обследованных больных СД 2 типа. Частота встречаемости мутантного Т аллеля в этой группе составила 64,6%, из них гомозиготный генотип ТТ имели 12,5%. Результаты генотипирования обследованных лиц с ожирением без сопутствующего СД 2 типа по полиморфному участку rs174583 гена FADS2 показали более высокую частоту встречаемости аллеля Т (67,9%), из них гомозиготный генотип ТТ составил 21,4%. Генотип СС выявлен у 32,1% пациентов с ожирением без сопутствующего СД 2 типа.

Заключение: результаты исследования свидетельствуют о более высокой частоте встречаемости аллеля Т полиморфизма rs174583 гена FADS2 у пациентов с ожирением без сопутствующего СД 2 типа.

ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОМАРКЕРОВ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА СРЕДИ ДВУХЛОКУСНЫХ ГАПЛОТИПОВ HLA-DRB1 ~ 7488 IL-17F У РУССКИХ ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Шмелькова Д.М.¹, Сташкевич Д.С.¹, Девальд И.В.^{1,2}, Хромова Е.Б.¹, Сулова Т.А.^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет»,

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Челябинская областная станция переливания крови», Челябинск, Россия

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое воспалительное заболевание, характеризующееся деструктивным поражением суставов и в значительной степени зависящее от аутоиммунных механизмов. РА входит в многочисленную группу мультифакторных заболеваний, для которых характерен выраженный клинический полиморфизм множества генов [2]. Генами первичной предрасположенности являются генные семейства локуса HLA-DRB1, относящегося ко второму классу HLA и располагающиеся на 6 хромосоме [3]. Кроме того, генами-кандидатами могут выступать гены цитокинов, выступающих непосредственными участниками иммунопатогенеза заболевания. Среди таких цитокинов особое внимание привлекает семейство интерлейкина 17, а именно IL-17F, который принимает участие в продуцировании ряда цитокинов и остром воспалении. Ген данного цитокина также расположен на 6 хромосоме и имеет несколько полиморфизмов, один из которых 7488 T/C (rs763780). При наличии мутантного аллеля С происходит замена His на Arg, при которой изменяется конформация и экспрессия белка, и в этом случае цитокин прикрепляется к своему рецептору без сигнала [1].

Ввиду расположения генов IL-17F и HLA-DRB1 на одной хромосоме можно предположить наличие неравновесного сцепления и формирование гаплотипов HLA-DRB1 ~ IL-17F, которые могут выступать в качестве факторов

риска развития мультифакторной патологии, в том числе ревматоидного артрита.

Цель исследования: изучить возможность формирования и параметры неравновесного сцепления и частоты гаплотипов HLA-DRB1 ~ 7488 IL-17F у пациентов с РА для создания дополнительных диагностических маркеров данной патологии.

Методы. ДНК-типирование генов HLA-DRB1* было проведено у 88 пациентов с РА и 115 здоровых лиц русской популяции методом ПЦР с использованием наборов Protrans (Protrans, Германия). SNP 7488 T/C IL-17 был обнаружен методом аллель-специфической ПЦР (ООО "Литех", Россия). Частоты гаплотипов (HF, %) и параметры неравновесного сцепления (D') были проанализированы с использованием программы Arlequin 3.5. Для выявления достоверности различий частот гаплотипов использовали критерий χ^2 Пирсона, в качестве меры количественной оценки взаимосвязи исхода и фактора определяли показатель отношения шансов (OR) с 95% доверительными интервалами (CI).

Результаты. Нами было установлено наличие неравновесного сцепления между SNP 7488 T/C IL-17F и генными семействами локуса HLA-DRB1 в обеих исследуемых группах. Всего было выявлено 23 гаплотипа, но статистическую значимость представляют лишь 6, которые представлены в таблице 1 и 2.

ТАБЛИЦА 1. СЦЕПЛЕНИЕ HLA-DRB1 С IL-17F 7488T/C В ГРУППЕ УСЛОВНО-ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Гаплотипы	Абсолютная частота (чел)	HF, %	D', χ^2 , p
HLA-DRB1*03 ~ IL-17F 7488*T	19	8	D'=0,8; $\chi^2=5,05$; p=0,02
HLA-DRB1*15 ~ IL-17F 7488*T	31	14	D'=0,6; $\chi^2=6,17$; p=0,01
HLA-DRB1*04 ~ IL-17F 7488*T	24	10	D'=0,5; $\chi^2=2,31$; p=0,13
HLA-DRB1*07 ~ IL-17F 7488*C	14	6	D'=0,2; $\chi^2=5,33$; p=0,02
HLA-DRB1*11 ~ IL-17F 7488*C	16	7	D'=0,5; $\chi^2=19,11$; p<<0,001

ТАБЛИЦА 2. СЦЕПЛЕНИЕ HLA-DRB1 С IL-17F 7488T/C В ГРУППЕ БОЛЬНЫХ РА

Гаплотипы	Абсолютная частота (чел)	HF, %	D', χ^2 , p
HLA-DRB1*04 ~ IL-17F 7488*T	57	32	D'=1; $\chi^2=12,04$; p<<0,001
HLA-DRB1*01 ~ IL-17F 7488*C	13	7	D'=0,5; $\chi^2=29,81$; p<<0,001

Нами показано, что в группе больных по сравнению с группой условно-здоровых лиц повышена частота HLA-DRB1*04 ~ IL-17F 7488*T (32% против 10% $\chi^2=30,44$; p<<0,001). Интересно отметить, что аллели этого гаплотипа имеют высокое неравновесное сцепление (D'=1; $\chi^2=12,04$; p<<0,001). Данный гаплотип может выступать фактором, повышающим вероятность развития ревматоидного артрита (OR=4,15 CI=[2,446; 7,029]).

С другой стороны, гаплотипы HLA-DRB1*03 ~ IL-17F 7488*T (D'=0,8; p=0,02, HF=8%) и HLA-DRB1*07 ~ IL-17F 7488*C (D'=0,2; p=0,02, HF=6%) оказались сцеплены только в группе сравнения, а у больных РА — нет (D'=-0,05; p=0,6, HF=12% и D'=-0,53; p=0,4, HF=0,07% соответственно).

Кроме того, с низкой частотой в группе больных по сравнению с группой условно-здоровых лиц встречалась комбинация HLA-DRB1*15 ~ IL-17F 7488*T (6% против 13% $\chi^2=6,75$; p=0,01 OR=0,34 CI=[0,184; 0,812]), причем пары аллелей в этом гаплотипе не находятся в достоверном генетическом сцеплении.

Также у больных РА не были выявлены носители гаплотипа HLA-DRB1*11 — IL-17F 7488*C, хотя частота его встречаемости в контроле составила 7%. При этом гаплотипы HLA-DRB1*07 ~ IL-17F 7488*C, HLA-DRB1*15 ~ IL-17F 7488*T и HLA-DRB1*11 ~ IL-17F 7488*C достоверно реже встречались в группе больных РА, поэтому могут прояв-

лять протективные свойства по отношению к патологии. Аллельный вариант DRB*07 ранее по литературным данным не отмечался как протективный [3]. Однако в сцеплении с IL-17F может являться фактором устойчивости к развитию заболевания.

Заключение. Установлен гаплотип, предрасполагающий к РА — HLA-DRB1*04 ~ IL-17F 7488*T, а также гаплотипы устойчивости к РА — HLA-DRB1*15 ~ IL-17F 7488*T, HLA-DRB1*07 ~ IL-17F 7488*C и HLA-DRB1*11 ~ IL-17F 7488*C. Результаты нашего исследования демонстрируют значимость совместного наследования SNP 7488T/C IL-17F и HLA-DRB1 для развития предрасположенности к ревматоидному артриту у русских Челябинской области.

Список используемой литературы:

1. Костарева О. С. и др. Интерлейкин-17: функциональные и структурные особенности; использование в качестве терапевтической мишени // Успехи биологической химии. — 2019. — Т. 59. — С. 393-418.
2. Ревматоидный артрит. Клинические рекомендации. — 2021
3. Хромова Е. Б. Полиморфизм генов HLA II класса и комбинация основных серологических маркеров в ассоциации с ревматоидным артритом в русской популяции Челябинской области : дис. — Челябинская государственная медицинская академия, 2009.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА КАТАЛАЗЫ У ДЕТЕЙ С ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА

Шкурат М.А. Машкина Е.В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Актуальность. Ожирение — мультифакторное хроническое заболевание, которое характеризуется избыточным накоплением жировой ткани и часто сопровождается метаболическими расстройствами. При этом, как ожирение, так и ассоциированные с ним патологические состояния характеризуются развитием окислительного стресса. Одним из ключевых регуляторов на окислительный стресс является

транскрипционный фактор Nrf2, кодируемый геном NFE2L2. Nrf2 участвует в регуляции транскрипции более 1000 генов, имеющих в промоторе элементы антиоксидантного ответа (ARE), в том числе SOD1, CAT, GPX и др. Каталаза предотвращает образование высокотоксичного гидроксильного радикала, катализируя расщепление перекиси водорода до воды и кислорода. Однонуклеотидная замена -262C>T (rs1001179)

в промоторе гена влияет на уровень транскрипции гена *CAT* и, соответственно, концентрацию каталазы в клетках.

Целью работы было изучить ассоциацию полиморфизма rs1001179 гена *CAT* с риском формирования избыточной массы тела у детей и подростков.

Материал и методы. Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенной из крови 410 детей и подростков в возрасте от 2 до 16 лет. Образцы были разделены на 2 группы: контрольная группа ($n = 131$) с нормальным индексом массы тела (ИМТ составил $18,6 \pm 0,12$) и группа детей с избыточным весом ($n = 279$, ИМТ = $25,8 \pm 0,19$). Генотипирование rs1001179 гена *CAT* проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческой тест-системы (Синтол, Россия).

Результаты. В контрольной группе аллель $-262A$ встречается с частотой 0,18, тогда как среди детей с избыточным весом данный показатель равен 0,25. Различия в частотах аллелей между двумя группами детей статистически значи-

мы ($p = 0,035$). Аллель $-262G$ ассоциирован с протективным эффектом ($OR = 0.7$ 95% CI 0.46 — 0.96). Для аллеля $-262A$ выявлена связь с повышением риска формирования избыточной массы тела ($OR = 1,5$ 95% CI 1,04 — 2,2). Доля гомозигот $-262AA$ в двух исследуемых группах детей сходна (5,3% в контроле и 5,8% среди детей с избыточным весом). Однако доля гетерозигот по полиморфизму среди детей с ожирением составила 38,1%, тогда как в контроле — 25,2%. Частота гомозигот $-262GG$ в группе сравнения — 56,1% (в контроле — 69,5%). Данные различия в частотах генотипов между двумя группами детей статистически значимы ($p = 0,029$).

Выводы. Аллель $-262A$ и генотип $-262GA$ ассоциированы с повышением риска формирования избыточной массы тела у детей и подростков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ TNF-ЗАВИСИМОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ АПОПТОЗА В ПОЗДНЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА

Эрдман В.В., Туктарова И.А., Тимашева Я.Р., Насибуллин Т.Р.

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН), Уфа, Россия

Введение. В пожилом возрасте на фоне изменения воспалительного статуса, а также в условиях снижения интенсивности анаболических процессов важно поддержание физиологического уровня молекул, обеспечивающих целостность и нормальное функционирование организма. Одним из важнейших для преклонного возраста молекулярных механизмов является апоптоз — программа, обеспечивающая саморегулирование количества здоровых клеток организма [Bazhanova E. D., Anisimov V. N., 2020]. В процессе апоптоза задействованы транскрипционные факторы (ТФ), такие, как NFκB, HIFα, p53 и др., которые стимулируются, в частности, цитокинами [Alberts B. et al., 2002]. В условиях повышения частоты воспалительных процессов с возрастом активность провоспалительных цитокинов TNFα, ILβ, IL-6 и др. играет ключевую роль в формировании адаптации организма к старческому фенотипу. При этом цитокининдуцированный апоптоз приводит к увеличению продукции АФК и снижению трансмембранного митохондриального потенциала, что свидетельствует о заинтересованности митохондриального пути в реализации данного вида клеточной смерти [Чечина О. Е. и др., 2009]. В частности, окислительный стресс стабилизирует белок p53 и влияет на экспрессию p53-регулируемых генов, в том числе кодирующих митохондриальные белки (BAX, NOXA, BCL2 и т.д.) [Simon H.U. et al., 2000; Степаненко И.Л., 2004]. Эффективность работы p53 является принципиальным для выживания в преклонном возрасте молекулярным бэкграундом, поскольку отвечает за инициацию распространенных среди пожилых людей онкопатологий [ArulJothi K.N. et al., 2023]. В целом, арест клеточного цикла, иницируемый таким мощным провоспалитель-

тельным фактором, как TNFα, специфичен для стареющего организма [Tanzer M.C., 2022], и может играть важную роль в формировании патологий возраста и физиологических возрастных процессах.

Цель. Исследование транскрипционной активности генов TNF-зависимого митохондриального пути апоптоза на поздних этапах онтогенеза человека.

Материалы и методы. Исследовано 130 здоровых лиц в возрасте от 22 до 100 лет. Образцы РНК получены из лимфоцитов периферической венозной крови. Анализ транскрипционной активности (ТА) генов ареста клеточного цикла *TNFA*, *FAS*, *FASLG*, *STAT3*, *TP53*, *BAX*, *BCL2*, *CASP4*, а также *IL6*, *IL1B*, *IL10*, *NFKB*, *HIFA*, *AKT1*, *IGF1*, *MTOR* проведен методом RT-PCR. Статистическая обработка полученных данных проведена с применением ΔΔCt-метода. Сравнительный анализ ТА генов выполнен между лицами среднего (22-60 лет), старческого (80-89 лет) возрастов и долгожителями (90-100 лет). Различия в уровне экспрессии генов (кратность изменения показателя относительной экспрессии — КОЭ) между возрастными группами считали статистически значимыми при $P < 0.05$.

Результаты. Сравнительный анализ экспрессии генов, кодирующих белки TNF-зависимого митохондриального пути апоптоза, между лицами разного возраста выявил, что в группе, представленной людьми старческого возраста, статистически значимо снижена ТА генов *TNFA* ($K_{03} = -2.49$, $P = 3.83 \times 10^{-3}$), *IL6* ($K_{03} = -3.28$, $P = 0.01$), *IL10* ($K_{03} = -3.03$, $P = 0.024$), *IGF1* ($K_{03} = -1.98$, $P = 5.97 \times 10^{-4}$) и *MTOR* ($K_{03} = -2.32$, $P = 0.0168$). ТА гена *TP53* среди лиц старческого возраста оказалась в три раза ниже, чем среди лиц

среднего возраста, однако показатель P не достиг уровня статистической значимости ($KOЭ = -3.07$, $P = 0.06$). Среди долгожителей, в сравнении с лицами старческого возраста, более чем в три раза повышен уровень ТА гена *IGF1* ($KOЭ = 3.27$, $P = 0.05$). Статистически значимые изменения в показателях ТА среди долгожителей, в сравнении с лицами среднего возраста, установлены для гена *TNFA* ($KOЭ = -2.75$, $P = 2.95 \times 10^{-4}$).

Выводы. При достижении старческого возраста и возраста долгожительства наблюдается снижение экспрессии гена *TNFA* — ключевого провоспалительного фактора, индуцирующего цитокиновый сигнальный путь апоптоза. Также для лиц старческого возраста установлены значимые изменения активности генов цитокинов *IL6* и *IL10*, ТФ *IGF1*, *MTOR* и *TP53*, вовлеченных в процессы старения и действующие на различные контрольные точки апоптоза. В целом, возрастное снижение экспрессии генов, входящих в цитокининдуцированный сигнальный путь апоптоза, более выражено для лиц старческого возраста, в то время как профиль экспрессии изучаемых генов специфичен для экстремального фенотипа долгожительства.

Исследование выполнено при финансовой поддержке мегагранта Правительства Российской Федерации (№ 2020-220-08-2197) и НИР (№ госрегистрации 122041400169-2).

Литература.

1. Bazhanova E.D., Anisimov V.N. FAS-and TNF-dependent ways participation in apoptosis mechanisms in hypothalamus in physiological and pathological aging // *Advances in Gerontology= Uspekhi Gerontologii*. 2020. V. 33. №. 1. P. 34-39.
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. Programmed cell death (apoptosis) // *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. — Garland Science, 2002.
3. Чечина О.Е., Биктасова А.К., Сазонова Е.В. и др. Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза // *Бюллетень сибирской медицины*. 2009. Т. 8. №. 2. С. 67-71.
4. Simon H.U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction // *Apoptosis*. 2000. V. 5. P. 415–418. <https://doi.org/10.1023/A:1009616228304>
5. Степаненко И.Л. Регуляция генных сетей стрессового ответа активными формами кислорода // *Экологическая генетика*. 2004. Т. 2. №. 1. С. 4-12.
6. ArulJothi K.N., Kumaran K., Senthil S. et al. Implications of reactive oxygen species in lung cancer and exploiting it for therapeutic interventions // *Medical Oncology*. 2023. V. 40, 43. <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01900-y>
7. Tanzer M.C. A proteomic perspective on TNF-mediated signalling and cell death // *Biochemical Society Transactions*. 2022. V. 50. №. 1. P. 13-20. doi: 10.1042/BST20211114.

РОЛЬ ГЕНОВ *MTRR* И *ADD1* И НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В РАЗВИТИИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Бордаева О.Ю., Алсет Д., Кулаева Е.Д., Деревянчук Е.Г.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Ключевые слова: преэклампсия, полиморфные варианты генов, *MTRR*, *ADD1*, микроРНК, днРНК

Введение. Преэклампсия (ПЭ) является распространенным заболеванием, характеризующимся гипертонией и протеинурией, которое встречается приблизительно в 5% — 8% беременностей во всем мире. Накопленные данные показали, что возникновению и развитию ПЭ способствует большое количество генов, среди которых особое место занимают гены фолатного цикла и гены, ассоциированные с артериальной гипертонией. Известно, что в регуляции экспрессии генов могут принимать участие как микроРНК, так и длинные некодирующие РНК, что позволяет считать их перспективными в отношении диагностики и терапии ПЭ.

Цель и задачи: исследовать полиморфные варианты генов фолатного цикла: *MTHFR*(C677T), *MTHFR*(A1298C), *MTRR*(A2756G) и *MTRR*(A66G), и генов, ассоциированных с артериальной гипертонией: *ADD1*(G1378T), *AGT*(T704C), *AGT*(C521T), *AGTR1*(A1166C), *AGTR2*(G1675A), *CYP11B2*(C344T), *GNB3*(C825T), *NOS3*(T786C), *NOS3*(G894T); осуществить поиск некодирующих РНК, связывающихся с ними, с помощью баз данных MirTarBase, miRDB и LncRNA2Target v3.0.

Материалы и методы. Обследованные женщины (средний возраст $27,22 \pm 6,35$), проживающие на территории Ростовской области, были разделены на две группы: с диагнозом ПЭ ($n=53$) и с физиологическим течением

беременности ($n=128$). Образцы крови и анамнез были предоставлены клинико-диагностической лабораторией «Наука» (Ростов-на-Дону, Россия). Для выделения геномной ДНК из лейкоцитов использовали набор реагентов «ПРОБА-НК» («ДНК-технология», Россия). Генотипирование проводили с помощью ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих наборов реагентов («ДНК-технология», Россия).

Распределение генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью критерия χ^2 . Тест χ^2 был использован для изучения различий по частоте аллелей и генотипов между исследуемыми группами. Для оценки ассоциации с ПЭ рассчитаны отношения шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ).

Для генов, которые показали значимые ассоциации с ПЭ, был осуществлен поиск некодирующих РНК, связывающихся с ними, с помощью баз данных MirTarBase, miRDB и LncRNA2Target v3.0.

Основные результаты. Полиморфные варианты генов *MTRR*(A66G) и *ADD1*(G1378T) показали статистически значимые ассоциации с ПЭ. Минорные аллели обоих генов могут быть предложены в качестве факторов риска ПЭ (ОШ = 1,734; 95% ДИ 1,088-2,765 при $p = 0,021$; $\chi^2 = 5,407$ и ОШ = 6,187; 95% ДИ 3,7-10,34 при $p < 0,001$; $\chi^2 = 53,8$ соответственно).

Кроме выше упомянутых микроРНК, в miRDB было статистически предсказано ещё 2 микроРНК (miR-338-5p, miR-374a-3p) для гена *MTRR* и 5 микроРНК (miR-4778-3p, miR-548ah-5p, miR-3609, miR-1283, miR-6742-5p) для гена *ADD1* с target score более 95/100.

По результатам поиска в базе данных LncRNA2Target v3.0, изменение экспрессии гена *MTRR* наблюдалось в исследованиях, связанных с нокадауном таких днРНК, как lincRX5, NORAD, SLNCR1, DANCR, TINCR, CCDC144NL-AS1, COSMOC, AK096729, LINC00920, LINC00920, MIR31HG, PIK3CD-AS2 и SRA, а также гиперэкспрессией днРНК NORAD, NBAT1 и SPRY4-IT1. Для гена *ADD1* было отмечено изменение экспрессии при нокауте lincFOX1, lincZFP161, RAD51-AS1, NORAD, LOC440173, TINCR, COSMOC, AK096729, DIGIT и гиперэкспрессии NBAT1, MIR503HG, LINC00473 и ZNF593-AS.

Заключение. В данном исследовании были выявлены значимые различия при сравнении распределения минорных аллелей *MTRR*(A66G) и *ADD1*(G1378T) в основной и контрольной группах, что указывает на их этиологическую роль в развитии ПЭ.

Биоинформатический анализ выявил широкий спектр микроРНК и днРНК, потенциально участвующих в регуляции генов, ассоциированных с ПЭ. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения их регуляторной роли, создания моделей днРНК-микроРНК-мРНК и их возможного использования для диагностики и терапии ПЭ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018.

ЭКСПРЕССИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК *LNCRNA-H19*, *LNCRNA-MALAT1*, *LNCRNA-MEG3*, *LNCRNA-DNM3OS*, *LNCRNA-TP53TG1*, *LINC00342* У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Корытина Г.Ф.^{1,2*}, **Маркелов В.А.**^{1,2}, **Гибадуллин И.А.**², **Зулкарнеев Ш.Р.**², **Азнабаева Ю.Г.**², **Ахмадишина Л.**^{3,1}, **Кочетова О.В.**¹, **Хуснутдинова Н.Н.**¹, **Ларкина А.П.**¹, **Авзалетдинов А.М.**², **Загидуллин Н.Ш.**²

¹ Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия;

² Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

Актуальность. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) — многофакторное хроническое гетерогенное воспалительное заболевание респираторной системы, с преимущественным поражением дистальных отделов дыхательных путей и легочной паренхимы. Несмотря на интенсивные исследования как молекулярных основ, так и различных клинических аспектов ХОБЛ, механизмы, лежащие в основе патогенеза ХОБЛ остаются до сих пор не полностью понятыми. Опубликованные данные свидетельствуют о том, что патогенез ХОБЛ может включать нарушение регуляции стрессовых реакций, препятствующих клеточному старению, включающий широкий круг сигнальных каскадов и их регуляторов. В последние годы некодирующий транскриптом человека оценивается учеными, фармакологами и медиками как возможность для разработки принципиально новых терапевтических стратегий и открытия биомаркеров многих заболеваний. Длинные некодирующие РНК (lncRNAs) лежат в основе тонкой регуляции сложных генных сетей на уровне эпигенетических изменений, транскрипции и посттранскрипционных преобразований, передавая и координируя информационные потоки, необходимые для функционирования сигнальных путей эукариотических клеток. Существует множество фактов, свидетельствующих о том, что они играют важную роль при различных заболеваниях, включая рак, сердечно-сосудистые заболевания и заболевания легких.

Целью исследования является поиск новых молекулярных маркеров хронической обструктивной болезни легких на основе анализа профиля экспрессии длинных некодирующих РНК (lncRNAs) *lncRNA-H19*, *lncRNA-MALAT1*, *lncRNA-MEG3*, *lncRNA-DNM3OS*, *lncRNA-TP53TG1*, *LINC00342* в легочной ткани и мононуклеарных клетках крови (PBMC) и оценка их функционального вклада в развитие ХОБЛ.

Материалы и методы исследования. Для исследования были сформированы следующие группы: 1 — ХОБЛ (N=89, возраст 44,34±13,91); 2 — контрольная группа (N=80, возраст 47,33±11,63). Диагноз ХОБЛ устанавливался с учетом рекомендаций рабочей группы по «Глобальной стратегии диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (<http://goldcopd.org>). Проведено выделение тотальной РНК из PBMC (ХОБЛ (N=89) / контроль (N=80)) и биоптатов легочной ткани (ХОБЛ (N=32) / контроль (N=22)) с использованием реактива и протокола TRIzol reagent, Invitrogen, UK (www.invitrogen.com). С использованием геномных баз данных StarBase, TargetScan, RegulomeDB и др. проведен предварительный биоинформационный анализ *in silico* для идентификации сети взаимодействующих мРНК, микроРНК, днРНК вовлеченных в ключевые сигнальные каскады, связанные с окислительным стрессом и развитием ХОБЛ и выбраны следующие гены длинных некодирующих РНК: *lncRNA-H19*, *lncRNA-MALAT1*, *lncRNA-MEG3*, *lncRNA-DNM3OS*, *lncRNA-TP53TG1*, *LINC00342*.

Синтез кДНК проведен с использованием набора реактивов «MMLV RT kit» (ООО Евrogen, Россия). Для определения уровня таргетных генов использованы наборы праймеров и целевых флуоресцентных зондов, дизайн и синтез праймеров осуществлялся ООО «ДНК-Синтез», DNA Synthesis, LLC. В качестве эндогенного контроля использовали ген домашнего хозяйства (B2M). ПЦР ставили в трех репликах объеме 25 мкл, содержащем реагенты для ПЦР «qPCRmix-HS HighROX», зонд, праймеры и 50 нг кДНК. Исследование уровня экспрессии проведено на приборе StepOnePlus (AB, США). Относительный уровень экспрессии оценивали с помощью ddCt метода. Различия в уровне относительной экспрессии между группой больных и контроля рассчитывали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (U-test) с использованием программного обеспечения Graphpad Prism 9 Software.

Результаты исследования. В группе больных ХОБЛ в легочной ткани было выявлено статистически значимое снижение экспрессии *lncRNA-MALAT1* в 2.059 раза (Fold change=0.48, Fold Regulation= -2.059, P=0.0055). Уровень экспрессии *lncRNA-TP53TG1* (Fold change=0.56, Fold Regulation=-1.78, P=0.07) и *LINC00342* (Fold change=0.42, Fold Regulation=-1.89, P=0.16) также был снижен в легочной ткани пациентов с ХОБЛ, однако различия не достигли уровня статистической значимости. Для генов *lncRNA-H19*, *lncRNA-MEG3*, *lncRNA-DNM3OS* уровень экспрессии был сходным у больных ХОБЛ и контрольной группы. В клетках PBMC группы больных с ХОБЛ было выявлено значимое снижение по сравнению с контролем уровня экспрессии генов *lncRNA-MALAT1* (Fold change=0.22, Fold Regulation=-4.47, P=0.0074), *lncRNA-TP53TG1* (Fold change=0.25, Fold Regulation=-4.01, P=0.0012) и *LINC00342* (Fold change=0.34, Fold Regulation=-2.88, P=0.05). Для генов *lncRNA-H19*, *lncRNA-MEG3*, *lncRNA-DNM3OS* значимых изменений уровня экспрессии в клетках PBMC больных ХОБЛ выявлено не было. *lncRNA-MALAT1* представляет собой *lncRNA*, участвующую в регуляции клеточного ответа на окислительный стресс и процессов клеточного старения. *lncRNA-MALAT1* транскрибируется с хромосомы 11q13.1, играет роль как

негативного, так и позитивного регулятора при окислительном стрессе, может регулировать экспрессию генов клеточного цикла, а также стабилизировать NRF2 для ослабления окислительного стресса и снижения уровня повреждения ДНК. Уровень *lncRNA-MALAT1* снижается в стареющих клетках. *lncRNA-MALAT1* подавляет экспрессию TP53 на уровне пре-мРНК, усиливает экспрессию *MMP9*, *PIK3CA* и активирует PI3K/AKT сигнальный каскад, связанный с клеточным старением. Ген *lncRNA-TP53TG1* расположен на хромосоме 7q21, участвует в ответе клетки на повреждение, является частью сигнального пути TP53. *lncRNA-TP53TG1*, активируя убиквитин-зависимую деградацию белка антиоксидантной системы клетки PRDX4, подавляет WNT/ β -катенин сигнальный путь, способствует апоптозу клеток, через активацию синтеза фермента PTEN и ингибирование PI3K/AKT-сигнального пути. Ген *LINC00342*, расположен на 2-ой хромосоме (2q11.1). Конкурентное связывание *LINC00342* с микроРНК miR-545-5p ведет к повышенной экспрессии сигнального регулятора 2 фактора роста фибробластов (CNPY2). Ранее было показано влияние *LINC00342* на экспрессию генов PTEN и TP53 сигналинга. Гены в сети коэкспрессии, связанной с геном *LINC00342* относятся к путям связанными с апоптозом и воспалительной реакцией. Показано, что сниженный уровень экспрессии гена *LINC00342* является одним из ключевых маркеров риска развития острого инфаркта миокарда, частой коморбидной патологии при ХОБЛ.

Выводы. В результате исследования установлено значимое снижение уровня экспрессии генов *lncRNA-MALAT1*, *lncRNA-TP53TG1* и *LINC00342* в клетках легочной ткани и клетках PBMC больных ХОБЛ. *lncRNA-MALAT1*, *lncRNA-TP53TG1* и *LINC00342* являются мультифункциональными и оказывают воздействие на патогенез ХОБЛ посредством различных механизмов. Связанные с клеточным старением и окислительным стрессом некодирующие РНК, как потенциальные биомаркеры и мишени для терапии, могут стать основой для разработки новой стратегии диагностики и лечения ХОБЛ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00019.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА CYP450 СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ПРИ НАЗНАЧЕНИИ ДВОЙНОЙ АНТИТРОМБОЦИТАРНОЙ ТЕРАПИИ

Кипень В.Н.¹, Зотова О.В.², Добыш О.И.¹, Королева Т.С.², Бейманов А.Э.², Стельмашок В.И.², Лемеш В.А.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² РНПЦ «Кардиология», Минск, Беларусь

Введение. Эффективность лечения заболеваний сердца и сосудов в значительной степени зависит от комплексного подхода при лечении больных ишемической болезнью сердца (ИБС). Коронарное стентирование все шире используется у пациентов как с острым коронарным синдромом (ОКС), так и при стабильных формах ИБС.

Для предотвращения тромбозов целесообразным является применение двойной антитромбоцитарной те-

рапии (ДАТ) — комбинация ацетилсалициловой кислоты (АСК) и клопидогрела/тикагрелолола.

ДНК-типирование по генам, ассоциированным с развитием тромбозов, наряду с определением степени агрегации тромбоцитов у пациентов с ИБС, имеющих показания к применению двойной антитромбоцитарной терапии, является актуальной задачей [1-4].

Цель и задачи. Определить частоту распростра-

ненности минорных аллелей для SNP (Single Nucleotide Polymorphism) генов семейства CYP450, по данным GWAS (Genome-Wide Association Study) ассоциированных с развитием тромбозов среди пациентов с ИБС из Республики Беларусь.

Материалы и методы. Материалом для молекулярно-генетических исследований являлась венозная кровь 90 пациентов с клинически верифицированным диагнозом ишемическая болезнь сердца (МКБ-10 I20-I25). Венозная кровь отбиралась в пробирки с цитратом натрия 3,8% Citrate (9NC 0,129M) IMPROVE. Выделение ДНК проведено с использованием набора на магнитных частицах MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra Kit (Applied Biosystems™, США). Средняя концентрация составила

62,3 нг/мкл (260/280 — 1,981). С использованием технологии KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) определены генотипы для клинически значимых полиморфизмов rs35835168 (CYP2C18), rs4244285 (CYP2C19), rs12248560 (CYP2C19), rs28399513 (CYP2C19) и rs1799853 (CYP2C9).

Основные результаты. В таблице приведены полученные результаты. Выявлено, что для rs35835168 (CYP2C18) частота минорного аллеля G составила 10,00% (95% ДИ 5,52-14,48), для rs4244285 (CYP2C19) аллель A — 10,00% (95% ДИ 5,52-14,48), rs12248560 (CYP2C19) аллель T — 35,56% (95% ДИ 28,40-42,72), rs28399513 (CYP2C19) аллель T — 11,67% (95% ДИ 6,87-16,47), rs1799853 (CYP2C9) аллель A — 10,00% (95% ДИ 5,52-14,48).

Полиморфизм	Ген	Генотип	Кол-во пациентов	Частота генотипа, %
rs35835168	CYP2C18	CC	72	80,00
		CG	18	20,00
		GG	–	–
rs4244285	CYP2C19	AA	–	–
		AG	18	20,00
		GG	72	80,00
rs12248560	CYP2C19	CC	33	36,67
		CT	50	55,56
		TT	7	7,78
rs28399513	CYP2C19	CC	69	76,67
		CT	21	23,33
		TT	–	–
rs1799853	CYP2C9	AA	–	–
		AT	18	20,00
		TT	72	80,00

Показано, что при сравнении с популяционными данными, полученными в рамках крупномасштабного проекта 1000Genomes для популяции «Еurore» наибольшее отклонение частоты распространенности минорных аллелей было характерно для rs12248560 (CYP2C19) и составило 13,13%. Наличие трех и более минорных аллелей по исследуемым полиморфизмам было выявлено у 20,0% пациентов, четырех — у 11,11% пациентов.

Заключение. В дальнейшем планируется продолжить молекулярно-генетические исследования (увеличение объема выборки до 150 пациентов с ИБС), а также провести ассоциативный анализ с клинико-патологической картиной заболевания.

Исследование выполнено в рамках проекта «Разработать и внедрить ДНК-технологии для персонализированного применения антиромботических лекарств при ишемической болезни сердца», ГП «Наукоёмкие технологии и техника» на 2021-2025 гг.,

подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии»

Литература:

1. Роль генетического тестирования в подборе оптимальной антиромботической терапии в лечении больных ишемической болезнью сердца / С.Т. Мацкеплишвили, Я.Э. Арутюнова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2014. Т.13(2). С.71-75
2. Рекомендации по антиромботической терапии при чрескожных вмешательствах на коронарных артериях / А.Л. Комаров // Атеротромбоз 2010. Т.1. С.87-95
3. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents // M. Pfisterer [et al.] // JACC. 2006. V.48. pp.2584-2591.
4. Система управления сердечно-сосудистыми рисками: предпосылки к созданию, принципы организации, целевые группы / Е.В. Шляхто [и др.] // Российский кардиологический журнал. 2019. Т.11. С.69-82.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ КОНТРОЛЯ КРЕТОЧНОГО ЦИКЛА И РЕПАРАЦИИ СРЕДИ ПОЛУЧАЮЩИХ НЕОАДЪЮВАНТНУЮ ПОЛИХИМИОТЕРАПИЮ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кипень В.Н.¹, Добыш О.И.¹, Ходоронок Е.И.², Хоров А.О.², Лемеш В.А.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, аг. Лесной, Беларусь

Введение. Система репарации ДНК является первым барьером на пути возникновения геномной нестабильности и канцерогенеза под действием мутагенов. Известно более 150 генов, принимающих участие в различных системах репарации [1]. Полиморфные варианты генов систем репарации ДНК могут изменять структуру репарационных ферментов, что непосредственно сказывается на их функциональной активности [2]. Поскольку ферменты функционируют как единый четко скоординированный комплекс, любые качественные или количественные отклонения его функций ведут к нарушениям процессов репарации ДНК, что инициирует каскад биологических реакций на клеточном, органном, организменном и популяционном уровнях, что способствует развитию онкологических и других мультифакториальных заболеваний (МФЗ) [3].

Клеточный цикл и процесс деления соматической клетки (митоз) находятся под строгим контролем сложной системы регуляции. Реаранжировки, амплификации или гиперэкспрессии циклиновых генов, а также повышенный уровень матричной РНК (мРНК) или белка циклинзависимых киназ встречаются при разных типах рака — в результате опухолевые клетки проходят через стадии клеточного цикла.

Существуют гены, которые интегрируют правильное восприятие средовых сигналов и соответствующий клеточный ответ. В клетках млекопитающих такую интегральную функцию выполняет ген TP53, который позволяет остановить клеточный цикл в неблагоприятных для развития условиях и предотвратить появление резистентных к повреждающим воздействиям клонов клеток. Приблизительно 50% первичных опухолей человека несут мутации TP53, также опухоли с мутантным вариантом гена TP53 клинически более агрессивны.

Современный подход дозирования лекарств при неоадьювантной (предоперационной) химиотерапии (НАХТ) должен учитывать индивидуальную способность пациента метаболизировать назначаемый химиопрепарат, что позволит достичь максимального противоопухолевого эффекта и свести к минимуму побочные явления индукци-

онной терапии. В качестве потенциальных биомаркеров эффективности НАХТ могут выступать полиморфизмы в генах, задействованных в контроле клеточного цикла, апоптозе и репарации ДНК.

Цель и задачи. Оценить частоту распространенности генотипов по SLC25A21 (rs1154121), TP53 (rs1042522), ATM (rs1801516), MDM2 (rs2279744), XRCC3 (rs861539), XRCC1 (rs25487) среди пациентов с раком молочной железы (РМЖ), которым проводилась неоадьювантная химиотерапия (НАХТ).

Материалы и методы. Материалом для молекулярно-генетических исследований являлась венозная кровь 150 пациентов с клинически верифицированным диагнозом злокачественное новообразование молочной железы (МКБ-10 C.50). Венозная кровь отбиралась в пробирки с цитратом натрия 3,8% Citrate (9NC 0,129M) IMPROVE. Для выделения ДНК из лейкоцитов отбирали аликвоту в 100 мкл, остаток хранили при -20 °С. Забор крови осуществляли сотрудники РНПЦ онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова (аг. Лесной, Республика Беларусь). ДНК выделяли из цельной крови с использованием набора «ArtДНК MiniSpin Эксперт» (ООО «АртБиоТех», Беларусь). Для установления аллельного состава генов SLC25A21 (rs1154121), TP53 (rs1042522), ATM (rs1801516), MDM2 (rs2279744), XRCC3 (rs861539), XRCC1 (rs25487) использовали наборы праймеров KASP by Design Primer Mix (LGC, Biosearch Technologies), содержащие аллель-специфичные праймеры для каждого исследуемого полиморфизма.

Основные результаты. В таблице приведены полученные результаты. Выявлено, что для rs1154121 (SLC25A21) частота минорного аллеля Т составила 31,00% (95% ДИ 25,65-36,35), для rs1042522 (TP53) аллель G — 32,67% (95% ДИ 27,25-38,09), для rs1801516 (ATM) аллель А — 12,67% (95% ДИ 8,82-16,52), для rs2279744 (MDM2) аллель G — 35,67% (95% ДИ 30,13-41,21), rs861539 (XRCC3) аллель А — 32,67% (95% ДИ 27,25-38,09), rs25487 (XRCC1) аллель Т — 36,00% (95% ДИ 30,45-41,55).

Полиморфизм	Ген	Генотип	Кол-во пациентов	Частота генотипа, %
rs1154121	SLC25A21	CC	69	46,00
		CT	69	46,00
		TT	12	8,00
rs1042522	TP53	CC	64	42,67
		CG	74	49,33
		GG	12	8,00

rs1801516	ATM	AA	3	2,00
		AG	32	21,33
		GG	115	76,67
rs2279744	MDM2	TT	62	41,33
		TG	69	46,00
		GG	19	12,67
rs861539	XRCC3	AA	15	10,00
		AG	68	45,33
		GG	67	44,67
rs25487	XRCC1	CC	63	42,00
		CT	66	44,00
		TT	21	14,00

Показано, что при сравнении с популяционными данными, полученными в рамках крупномасштабного проекта 1000Genomes для популяции «Еurore» наибольшие отклонение частоты распространенности минорных аллелей были характерны для rs861539, rs1154121 и rs1042522 — 7,46%, 5,10% и 4,87% соответственно. Наличие четырех и более минорных аллелей по исследуемым полиморфизмам было выявлено у трети пациентов, пяти — у 13,3% пациента.

Заключение. В дальнейшем планируется продолжить молекулярно-генетические исследования (увеличение объема выборки до 215 человек), а также провести ассоциативный анализ с клинико-морфологическими характеристиками опухоли при НПХТ для пациентов с РМЖ.

Исследование выполнено в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма 3.2 «Геномика, эпигеноми-

ка, биоинформатика» на 2021-2025 гг., задание «Роль полиморфных вариантов ряда генов, ассоциированных с метаболизмом лекарственных средств, в формировании противоопухолевого ответа на неоадьювантную химиотерапию при раке молочной железы» на 2021-2023 гг.

Литература:

1. Human DNA repair genes, 2005 / R. Wood [et al.] // Mutat. Res. 2005. Vol. 577. P. 275-283.
2. Enzymes of Direct, Excision, and Mismatch DNA Repair in Pro- and Eukaryotes and Their Biological Role / N. Vasilenko [et al.] // Molecular Biology. 2003. Vol. 37, № 6. P. 803-817.
3. XPD polymorphisms, cigarette smoking, and bladder cancer risk: a meta-analysis / M. Wang [et al.] // J. Toxicol. Environ. Health A. 2009. Vol. 72, № 11. P. 698-705.

REPLICATIVE ASSOCIATIVE ANALYSIS OF 45 GENETIC VARIANTS (SNV) THAT HAVE FOUND ASSOCIATIONS WITH BEHAVIORAL DEVIATIONS, WITH THE SUSCEPTIBILITY TO SCHIZOPHRENIA IN THE RUSSIAN POPULATION

Andrey V. Marusin¹, Maria G. Swarovskaja¹, Anna V. Bocharova¹, Ksenia V. Vagaitseva¹, Alexander N. Kornetov², Svetlana A. Ivanova³, Oksana A. Makeeva⁴, Vadim A. Stepanov¹

¹ The Research Institute for Medical Genetics, National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation,

² Federal State Budgetary Institution of Higher Education "Siberian State Medical University" of the Ministry of Health of Russia, Tomsk, Russian Federation,

³ Mental Health Research Institute, National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation,

⁴ Nebbiolo Center for Clinical Trials, Tomsk, Russian Federation.

Background/Objectives: The genetic basis of schizophrenia has long been known through its tendency to run in families, as well as through adoption studies and twin studies. The heritability (genetic contribution to the phenotypic variance observed) is generally accepted to be in the range of 64–81% [Bergen & Petryshen, 2012]. Candidate gene association studies have implicated myriad putative risk genes; however, insight to the etiological and pathophysiological basis of this disorder is far from a final

resolution. The aim of this work was the association analysis of 45 SNVs with schizophrenia in Russian.

Methods: The study was carried out on a population sample of the 431 individuals (112 men and 319 women; 93.3% Russian; Control). The second group consisted of 259 people with alcoholism (263 men and 96 women; 100% Russian; Case). On the basis of the selected 45 markers was formed multiplexed SNVs panel. Genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry on Sequenom MassArray platform was

performed. The relationship between the studied genotypes and the susceptibility to schizophrenia were analyzed by using the maximum likelihood Chi-square test.

Results: Only two variants that were statistically significantly ($p < 0.02$) associated with schizophrenia were identified. These were variants in the intergenic region NPBWR1, OPRK1 (neuropeptides B and W receptor 1, opioid

receptor kappa 1) rs2376427 and intron variant rs349306 in the gene ARID3A (AT-rich interaction domain 3A). Earlier, according to GWAS, these polymorphic variants showed an association with schizophrenia.

Conclusion: The obtained data confirm in the Russian population the previously identified associations by the GWAS method.

ИДИОПАТИЧЕСКИЙ ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ И COVID-19-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ: РОЛЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В МОЛЕКУЛЯРНОМ ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Зулкарнеев Ш.Р.¹, Корыгина Г.Ф.^{1,2}, Маркелов В.А.^{1,2}, Гибадуллин И.А.¹, Зулкарнеев Р.Х.¹, Авзалетдинов А.М.¹, Загидуллин Н.Ш.¹

¹ Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия;

² Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия.

Актуальность. Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) является интерстициальным заболеванием легких с неизвестной причиной и неясным патогенезом, быстро прогрессирующим и не имеющего эффективного лечения. Одним из самых грозных осложнений после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 является легочный фиброз. Механизмы которые запускают легочный фиброз и приводят к его быстрому прогрессированию остаются в значительной степени неопределенными. В течение последнего десятилетия значительно изменились представления о патогенезе ИЛФ, считается, что этиопатогенез и прогрессирование ИЛФ тесно связаны с постоянным повреждением эпителия и дисфункцией между эпителиальными и мезенхимальными клетками после активации фибробластов. Имеются данные о вкладе иммунных и генетических факторов в развитие данного заболевания. Среди последних на сегодняшний день активно изучается роль длинных некодирующих РНК (днРНК). Они представляют собой одноцепочечные РНК длиной более 200 пар оснований, осуществляющие регуляцию экспрессии генов, транскрипции, трансляции, созревания белков и многие другие функции, в том числе благодаря связыванию и ингибированию микроРНК (миРНК), которые, в свою очередь, ингибируют мРНК.

Целью исследования является анализ экспрессионного профиля длинных некодирующих РНК, вовлеченных регуляцию процесса активации фибробластов легких, трансдифференцировку и старение эпителиальных клеток (H19, MALAT1, MEG3, DN3OS, TP53TG1, LINC00342) в легочной ткани и мононуклеарных клетках крови (PBMC) больных с ИЛФ и COVID-19 индуцированным легочным фиброзом.

Материалы и методы исследования. В рамках исследования нами осмотрен 251 пациент с легочными патологиями. Для комплексного клинико-генетического исследования были сформированы следующие группы: 1 — пациенты с подтвержденным диагнозом идиопатический легочный фиброз (N=10); 2 — пациенты с диагнозом

легочный фиброз после перенесенного 6-12 месяцев назад COVID-19 (N=16); 3 — контрольная группа (N=59). Диагноз ИЛФ устанавливался с учетом критериев диагностики согласно Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению ИЛФ. У всех участников исследования были собраны образцы цельной венозной крови и образцы легочной ткани, полученной после проведения трансбронхальной или транстрахеальной биопсии легочной ткани, дополненной, при отсутствии противопоказаний, видеоторакоскопической биопсией легкого. Получен биоптат легочной ткани минимальными размерами 3*3 мм и зафиксирован в растворе «Фиксатор IntactRNA» для стабилизации РНК. Изоляция мононуклеарных клеток (моноцитов и лимфоцитов, PBMC) из цельной крови проводилась в градиенте плотности фикола. Тотальная РНК была выделена из PBMC периферической крови и образцов тканей с использованием реактива и протокола «ExtractRNA», Евроген, Россия (www.evrogen.ru), согласно протоколу производителя.

С использованием геномных баз данных StarBase, RegulomeDB, Diana, miRDB, TargetScan NONCODE, lncRNADisease и на основании анализа сигнальных путей и клеточных функций с использованием базы KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes genes ontology) проведен предварительный биоинформационный анализ *in silico* для идентификации сети взаимодействующих мРНК, миРНК, lncRNA вовлеченных в ключевые сигнальные каскады, связанные с развитием легочного фиброза: активацию фибробластов легких, трансдифференцировку и старение эпителиальных клеток. По результатам поиска для анализа в были выбраны следующие гены длинных некодирующих РНК: TP53TG1 (ID: 11257) (TP53 target 1), LINC00342 (ID: 150759) (long intergenic non-protein coding RNA 342), H19 (ID: 283120) (H19 imprinted maternally expressed transcript), MALAT1 (ID: 378938) (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1), DN3OS (ID: 100628315) (DNM3 opposite strand/antisense RNA), MEG3 (ID: 55384) (maternally expressed 3). Качество и ко-

личество матрицы РНК определяли на спектрофотометре «NanoDrop 1000». Синтез кДНК проведен с использованием набора реактивов «MMLV RT kit» (ООО Евrogen, Россия). Исследование уровня экспрессии проведено на приборе StepOnePlus (AB, США). Относительный уровень экспрессии оценивали с помощью ddCt метода, в каждую реакцию включая отрицательный контроль. В качестве референса использовали ген домашнего хозяйства B2M. Различия в уровне относительной экспрессии между группой больных и контроля рассчитывали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (U-test) с использованием программного обеспечения MedCalc.

Результаты исследования. В группе больных ИЛФ в клетках легочной ткани было выявлено статистически значимое снижение экспрессии гена DNМ3ОS в 2,28 раза (Fold change=0.44, Fold Regulation=-2.28, P=0.0258) и увеличение уровня экспрессии гена LINC00342 в 2,917 раза (Fold change=2.917, Fold Regulation=2.917, P=0.0365). У больных COVID-19-индуцированным легочным фиброзом отмечено увеличение уровня экспрессии генов LINC00342 в 2,077 раза (Fold change=2.077, P=0.49) и H19 в 2,723 раза (Fold change=2,723, P=0.58), однако различия не достигли уровня статистической значимости. Для генов MALAT1, MEG3, TP53TG1 уровень экспрессии у больных был сопоставим с таковым в контрольной группе. В клетках PBMC группы больных с ИЛФ было выявлено значимое сниже-

ние уровня экспрессии генов MEG3 (Fold change=0.09, Fold Regulation=-10.569, P=0.0254). У больных COVID-19-индуцированным легочным фиброзом было выявлено статистически значимое снижение экспрессии генов TP53TG1 (Fold change=0.189, Fold Regulation=-5.27, P=0.017) LINC00342 (Fold change=0.27, Fold Regulation=-3.74, P=0.0346) MALAT1 (Fold change=0.22, Fold Regulation=-4.532, P=0.047) и DNМ3ОS (Fold change=0.405, Fold Regulation=-2.463, P=0.0203).

Выводы. Нами были впервые получены данные об уровне экспрессии генов днРНК H19, MALAT1, MEG3, DNМ3ОS, TP53TG1, LINC00342 в группах больных ИЛФ и COVID-19-индуцированным фиброзом в различных тканях. Установлено, что профиль экспрессии днРНК у больных с легочным фиброзом различной этиологии отличается в различных типах тканей. В результате исследования установлено значимое изменение уровня экспрессии генов MALAT1, MEG3, DNМ3ОS, TP53TG1, LINC00342 при ИЛФ и COVID-19-индуцированном фиброзе легких. Данные днРНК являются мультифункциональными и могут выступать в качестве индуктора ремоделирования легочной ткани при легочном фиброзе посредством различных механизмов. Исследование молекулярных механизмов развития фиброза легких позволит усовершенствовать методики диагностики и терапии заболевания. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00019.

ПОИСК ИНФОРМАТИВНЫХ ПРЕДИКТОРОВ ИНФАРКТА МИОКАРДА ПО СОЧЕТАНИЯМ ПОЛИМОРФНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ ГЕНОВ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА, АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И АПОПТОЗА

Насибуллин Т.Р., Тимашева Я.Р., Эрдман В.В., Туктарова И.А., Корытина Г.Ф.

Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054, Пр. Октября, 71
nasibullintr@yandex.ru

Инфаркт миокарда (ИМ) — один из наиболее тяжелых клинических вариантов ишемической болезни сердца — по-прежнему остаётся наиболее частой причиной инвалидизации и смерти населения развитых стран мира.

ИМ в подавляющем большинстве случаев представляет собой многофакторное, полигенное заболевание развитие которого обусловлено множеством сложно взаимодействующих генетических факторов и факторов внешней среды. Как следствие, вклад отдельных ДНК маркеров в развитие патологии невелик, а то и вовсе может существенно варьировать в зависимости от сопутствующих факторов, что делает изучение таких маркеров малопригодным для практического здравоохранения.

Исходя из вышеизложенного, с целью выявления информативных маркеров высокого риска ИМ, нами проведён анализ ассоциаций с ИМ сочетаний полиморфных маркеров генов, продукты которых участвуют липидном обмене (rs1042034*APOB, rs4420638*APOC1, rs838880*SCARB1, rs2230806*ABCA1, rs11053646*OLR1), системе антиокси-

дантной защиты (rs662*PON1, rs7493*PON2, rs1001179*CAT, rs2070424*SOD1, rs10098474*MSRA, rs1695*GSTP1), апоптозе (rs1052571*CASP9, rs3834129*CASP8, rs1042522*TP53, rs12454712*BCL2, rs2149954*LINC02227, rs6048205*LINC00261, rs619586*MALAT1, rs2850711*LINC00305, rs4977574*CDKN2B_AS1, rs3758391*SIRT1, rs9349379*PHACTR1).

Материалом для исследования были ДНК больных, перенёсших ИМ в возрасте от 30 лет до 60 лет (358) и соответствующей контрольной группы (283). Все больные находились на лечении в Республиканском кардиологическом диспансере г. Уфы. Все участники исследования были мужчинами, русскими по этнической принадлежности.

Генотипирование полиморфных маркеров проводили с помощью аллель-специфичной ПЦР. Детекцию полученных ампликонов выполняли методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Поиск сочетаний, ассоциированных с ИМ осуществлялся с использованием программного обеспечения APSampler, с использованием метода Монте-Карло, цепи Маркова и Бай-

есовскую непараметрическую статистику. В качестве поправки на множественность сравнений применялся FDR тест. Критериями отбора выявленных сочетаний были $P < 0.01$, $OR > 3$.

В результате проведенного анализа были выявлены сочетания, ассоциированные с повышенным риском ИМ (таблица).

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА АССОЦИАЦИЙ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ С ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Сочетание	Больные (%)	Контроль (%)	P(FDR)	OR	95%CI
<i>LINC00305</i> *T+ <i>GSTP1</i> *G/G+ <i>CASP9</i> *A	13.20	3.21	0.0054	4.58	2.2-9.52
<i>GSTP1</i> *G/G+ <i>CASP9</i> *A+ <i>TP53</i> *C	13.71	3.57	0.005	4.29	2.13-8.65
<i>GSTP1</i> *G/G+ <i>ABCA1</i> *G+ <i>CASP9</i> *A	12.68	3.21	0.0045	4.37	2.1-9.1
<i>LINC02227</i> *A+ <i>PON2</i> *G+ <i>CDKN2B-AS1</i> *G+ <i>APOC1</i> *G	9.55	2.12	0.006	4.87	2.02-11.78
<i>OLR1</i> *G+ <i>APOC1</i> *G+ <i>CASP8</i> *I+ <i>FAS</i> *A	4.46	0	0.008	6.24	2.3-16.94
<i>PHACTR1</i> *A+ <i>OLR1</i> *G+ <i>APOC1</i> *G+ <i>CASP9</i> *A+ <i>SIRT1</i> *C	4.47	0	0.008	6.2	2.28-16.85
<i>GSTP1</i> *G+ <i>OLR1</i> *G+ <i>APOC1</i> *G	5.34	0.35	0.009	15.9	2.12-119.5
<i>CAT</i> *C+ <i>OLR1</i> *G+ <i>APOC1</i> *G+ <i>TP53</i> *C+ <i>FAS</i> *A	5.98	0.35	0.0057	17.95	2.4-134.26

Выявленные сочетания аллелей и генотипов, в случае подтверждения полученных результатов на независимой выборке, могут служить основой для создания теста по идентификации лиц с высоким риском ИМ.

Исследование проведено в рамках НИР № 122041400169-2; исследование частично поддержано мегагрантом Правительства Российской Федерации (2020-220-08-2197, соглашение № 075-15-2021-595).

Раздел 15. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРОМА БОЛЬШОГО ПОДКОВОНОСА (*RHINOLOPHUS FERRUMEQUINUM*), СЕВЕРО-ВОСТОЧНЫЙ КАВКАЗ, ДАГЕСТАН, 2023

Алексеев А.Ю.^{1,2}, Дубовицкий Н.А.¹, Соболев И.А.¹, Шаршов К.А.¹, Хозяинова А.А.³, Жигалин А.В.^{1,2}, Логинова А.М.¹, Гаджиев А.А.^{1,2}, Шестопалов А.М.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт вирусологии Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия.

² Институт экологии и устойчивого развития Дагестанского государственного университета, Махачкала, Россия.

³ Научно-исследовательский институт онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия
адрес электронной почты: ayalekseev@frcftm.ru

Введение. Летучие мыши принадлежат к отряду *Chiroptera*, насчитывающего более 1420 видов и представляют собой вторых по разнообразию млекопитающих после грызунов. Они широко распространены по всему миру, за исключением Антарктиды. Показано, что летучие мыши являются естественными резервуарами различных вирусов. Известны случаи передачи вирусов от летучих мышей к людям и/или животным, что приводило к вспышкам инфекционных заболеваний. В связи с этим особенно важно проводить оценку виroma у летучих мышей для выявления вирусов с потенциалом межвидовой передачи.

Северо-восточная часть Кавказа и побережье Каспийского моря являются развивающимся регионом, с огромной долей сельскохозяйственных угодий и активным развитием туризма. Ранее Альховский с соавторами (2020) показали широкую распространенность Sars-подобного коронавируса Хоста-1 (14%) в подковоносах (большом и малом) в западной части Кавказа (побережье Черного моря). Однако, помимо этого, имеется очень мало данных о вирусах, циркулирующих в популяциях летучих мышей Кавказа.

Большой подковонос (*Rhinolophus ferrumequinum*) являются самым крупным представителем подковоносов в Европе. Считаются оседлыми животными, перемещающимися на несколько сотен километров (100-500 км) с мест летнего обитания на места зимовок.

Целью нашей работы было провести анализ виroma фекалий Большого подковоноса (*Rhinolophus ferrumequinum*) в северо-восточной части Кавказского региона (Республика Дагестан).

Материалы и методы. Весной 2023 года на территории Республики Дагестан были отловлены самцы Большого подковоноса и проведен индивидуальный сбор фекалий. Летучих мышей выпускали сразу после сбора образцов. Фекалии трех животных были объединены в единый пул, с которым были проведены дальнейшие работы. Идентификация вида летучих мышей была проведена квалифицированным зоологом-систематиком в месте отбора проб.

Перед выделением нуклеиновых кислот проводили обогащение пробы вирус подобными частицами по протоколу NetoVir (Conceição-Neto с соавт., 2018). Для этого полу-

чали 20% суспензию фекалий, после чего осаждали крупные частицы при помощи центрифугирования и использовали надосадочную жидкость для фильтрации с последующей обработкой нуклеазами. Из обогащенного образца выделяли нуклеиновые кислоты при помощи набора для выделения РНК на колонках (Биолабмикс, Россия). С полученным образцом нуклеиновых кислот проводили полнотранскриптомную амплификацию с использованием набора WTA2 (Sigma Aldrich, США). Библиотеки для секвенирования готовили при помощи набора КАРА HyperPrep (Roche, Швейцария). Секвенирование проводили на Genolab M (GeneMind, Китай) с получением парных прочтений 2x150.

Полученные прочтения обрабатывали при помощи ПО Trimmomatic. Отфильтрованные прочтения использовали в метагеномной сборке при помощи ПО metaSPAdes. Полученные прочтения использовали для идентификации ближайших совпадений в неизбыточной базе данных аминокислотных последовательностей NCBI. Визуализацию таксономии проводили при помощи ПО KronaTools.

Результаты и обсуждение. Среди идентифицированных последовательностей, доля прочтений, принадлежащих на вирусные прочтения, составила 57,45% (3625462 прочтения), при этом доля прочтений РНК-вирусов составила всего 0,068%. Выявленные вирусы эукариот принадлежали к семействам *Parvoviridae*, *Coronaviridae*, *Retroviridae*, *Anelloviridae*. Выявленные бактериофаги принадлежали к классу *Caudoviricetes*. На малопротяженные фрагменты последовательностей вирусов семейства *Parvoviridae* приходится более 50% всех прочтений. Последовательность длиной 1219 нуклеотидов включала фрагмент открытой рамки считывания (229 аминокислот) наибольшей, однако низкой аминокислотной идентичности (45,41%) к капсидному белку 1 тетрапарвовируса опоссума (YP_010802413). Другая последовательность также имела наибольшую идентичность (60,65%) с полной аминокислотной последовательностью неструктурного белка 1 тетрапарвовируса опоссума (YP_010802412.1). Также была обнаружена последовательность бокапарвовируса, неструктурный белок 1 которого имел идентичность более 92% с бокапарвовирусом (AQX45759), найденным у большого подковоноса

в Китае в 2013 году. Нуклеотидная последовательность имела идентичность 88,62% с бокапарвовирусом большого подковоноса из Китая (KX343069.1).

Доля прочтений, приходящаяся на последовательности представителей семейства *Coronaviridae* рода *Betacoronavirus* составила всего 0,04%. Фрагменты имели длину от 604 до 2802 нуклеотидов. Нуклеотидная последовательность наиболее протяженного фрагмента включала гены N и M и имела идентичность 97,88% с последовательностью коронавируса Khosta-1, идентифицированного у большого подковоноса в городе Сочи в России в 2020 году (MZ190137.1). Фрагмент нуклеотидной последовательности гена РНК-зависимой РНК-полимеразы (2432 нукл.) также имел наибольшую идентичность с последователь-

ностью вируса Khosta-1 (97,55%)

Собранные контиги этих вирусных прочтений представляют собой фрагменты геномов вирусов, которые демонстрируют сходство с вирусами летучих мышей и других млекопитающих, а также бактерий

Заключение. Вирусные метагеномные данные, представленные в этом исследовании, дают обзор виroma северо-восточной популяции Большого подковоноса Кавказа. Были идентифицированы последовательности, относящиеся к 4 семействам вирусов эукариот. Это исследование значительно способствует лучшему пониманию глобального разнообразия вирусов летучих мышей в целом.

Работа выполнена при поддержке проекта Российского научного фонда № 22-24-00617.

ЗАРАЖЕННОСТЬ ПАТОГЕНАМИ ИКСОДИД, СОБРАННЫХ НА ПАСТБИЩАХ РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ

Щучинова Л.Д.¹, Бондаренко Е.И.², Щучинов Л.В.¹, Ечешева А.В.³, Яковлева Н.А.³, Черткова Е.П.⁴

¹ ФБУН «Новосибирский НИИ гигиены» Роспотребнадзора, Новосибирск, Россия

² АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

³ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Алтай», Горно-Алтайск, Россия

⁴ Алтайский государственный природный биосферный заповедник, г. Горно-Алтайск, Россия

Введение. Горный рельеф Республики Алтай обуславливает ее животноводческую специализацию из-за малой площади пахотных земель (1,5%). Количество сельскохозяйственных животных в республике по данным Алтайстата составляло на 01.01.2022 года 755277 голов, то есть в среднем на одного жителя приходилось 3-4 головы животных. Скот является основным прокормителем иксодид на пастбищах и способствует постоянному заносу клещей в села, так как участки выпаса находятся вокруг каждого населенного пункта. Численность иксодовых клещей на пастбищах достигает 600 экз./флага/км. Опросы сельских жителей свидетельствуют, что 70-80% лиц, пострадавших от присасывания иксодид, подверглись нападению переносчиков непосредственно в черте села или в его окрестностях.

Цель работы — исследование индивидуальной зараженности иксодид, собранных на пастбищах, расположенных в окрестностях населенных пунктов.

Материалы и методы. Сбор клещей проведен по стандартной методике на флаг в апреле-мае 2022 года в 6 районах Республики Алтай — Майминском, Турачакском, Чемальском, Шебалинском, Онгудайском, Кош-Агачском. При ПЦР-исследовании иксодид использовали тест-системы АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) «РеалБест ДНК *Rickettsia sibirica/Rickettsia heilongjiangensis*», «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi s. l./РНК ВКЭ*» «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis*».

Основные результаты. Всего было исследовано 987 экземпляров переносчиков, в том числе *Dermacentor nuttalli* — 494 экз. (50,1%), *Dermacentor reticulatus* — 103 экз. (10,4%), *Dermacentor silvarum* — 32 экз. (3,2%), *Haemaphysalis concinna* — 13 экз. (1,3%), *Ixodes persulcatus* — 345 экз. (34,9%). На открытых пастбищных участках во

всех местах сбора доминировали клещи рода *Dermacentor* (63,8%), за исключением Турачакского района, где абсолютным доминантом являлся клещ *I. persulcatus*.

Следует заметить, что высота местности над уровнем моря (н.у.м.) влияет на видовое распределение иксодовых клещей. В предгорье (ниже 800 м н.у.м.) на пастбищах Турачакского района были собраны клещи *I. persulcatus*; в поливекторных пастбищных очагах Майминского района собраны 4 вида клещей (*D. reticulatus, D. silvarum, H. concinna, I. persulcatus*), на пастбищах Чемальского района — 3 вида иксодид (*D. nuttalli, H. concinna, I. persulcatus*). В среднегорье (800-1700 м н.у.м.) на участках выпаса Шебалинского района собрано 3 вида переносчиков (*D. silvarum, D. reticulatus, H. concinna*), на пастбищах Онгудайского района — клещи *D. nuttalli*. На пастбищах высокогорного (выше 1700 м н.у.м.) Кош-Агачского района были собраны только клещи *D. nuttalli*.

Зараженность клещей *I. persulcatus* возбудителями клещевых трансмиссивных инфекций составила 53,0% (183 положительных экземпляра из 345 исследованных). Обнаружены маркеры 5 патогенов: РНК вируса клещевого энцефалита выявлена у 1,2% иксодид (в 4 из 345 исследованных экземпляров), ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* — у 40,8% (в 141 из 345 экз.), ДНК *Anaplasma phagocytophilum* — у 0,9% (в 3 из 345 экз.), ДНК эрлихий — у 1,2% (в 4 из 345 экз.), а 8,9% экземпляров таежных клещей содержали несколько возбудителей.

Зараженность клещей *H. concinna* составила 38,4% (из исследованных 13 экземпляров в 1 экз. обнаружена РНК вируса клещевого энцефалита, в 4 экз. — ДНК *B. burgdorferi s. l.*)

В переносчиках *D. reticulatus* и *D. silvarum* патогенов не обнаружено.

Зараженность иксодид *D. nuttalli* составила 7,5% (в 1 экземпляре обнаружена РНК вируса клещевого энцефалита, в 36 экземплярах — ДНК *R. sibirica*), причем в высокогорном Кош-Агачском районе она была в 2,2 раза ниже, чем в Онгудайском районе, относящегося к среднегорью (5,8% против 12,6%).

Сельскохозяйственные животные, как прокормители

пастбищных клещей, активно поддерживают циркуляцию патогенов: в целом из 987 исследованных экземпляров переносчиков 224 экземпляра (22,6%) содержали возбудителей инфекций, а наиболее высокая зараженность иксодид отмечалась в предгорном Турачакском районе (57,6%), где в сборах присутствовал только клещ *I. persulcatus* (таблица).

ТАБЛИЦА. РЕЗУЛЬТАТЫ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ ПАСТБИЩНЫХ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ НА ЗАРАЖЕННОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ КЛЕЩЕВЫХ ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ (2022 Г.)

Высота (м) н.у.м.	Район сбора	Виды клещей	Иссле- до- вано клещей (экз.)	Выявлены патогены					Риккетсии
				ВКЭ	Боррелии	Анаплазмы	Эрлихии	2 и более	
< 800 м	Турачакский	<i>I. persulcatus</i>	281	4	120	3	4	31	
	Майминский	<i>I. persulcatus</i>	47		11				
		<i>H. concinna</i>	8	1	1				
		<i>D. reticulatus</i>	101						
		<i>D. silvarum</i>	2						
	Чемальский	<i>I. persulcatus</i>	17		9				
		<i>H. concinna</i>	1						
<i>D. nuttalli</i>		90	1					7	
800–1700 м	Шебалинский	<i>D. silvarum</i>	30						
		<i>D. reticulatus</i>	2						
		<i>H. concinna</i>	4		3				
	Онгудайский	<i>D. nuttalli</i>	79						10
>1700 м	Кош-Агачский	<i>D. nuttalli</i>	325						19
	Всего		987	6	144	3	4	31	36

Выводы. Исследование показало, что 22,6% пастбищных клещей заражены каким-либо патогеном: в том числе доля переносчиков, зараженных вирусом КЭ составила 0,6%, боррелиями — 14,6%, анаплазмами — 0,3%, эрлихиями — 0,4%, *R. sibirica* — 3,6%, двумя и более патогенами —

3,1%. Видовая зараженность иксодид была также высокой: *I. persulcatus* — 53,0%, *H. concinna* — 38,4%, *D. nuttalli* — 7,5%, что свидетельствует о высоком риске заражения сельского населения (особенно в предгорных территориях) и необходимости обязательных акарицидных обработок скота и пастбищ.

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ТРИМЕРИЗОВАННОГО ВАРИАНТА ПОВЕРХНОСТНОГО ГЛИКОПРОТЕИНА GPC ВИРУСА ЛАССА ПОЛУЧЕННОГО ПРИ ПОМОЩИ КЛЕТОК СНО-К1

Волкова Н.В., Арипов В.С., Исаева А.А., Пьянков О.В., Ильичев А.А., Пьянков С.А., Щербаков Д.Н.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Введение: в настоящее время случаи заболевания, вызванные вирусом Ласса (LASV), все чаще регистрируются за пределами традиционно эндемичных районов Западной Африки. Эта тенденция свидетельствует о потенциальной биоугрозе для всего мира. Эффективная профилактическая вакцина против лихорадки Ласса до сих пор не разработана. Единственной одобренной терапией геморрагической

лихорадки Ласса является рибавирин, однако этот препарат обладает рядом побочных эффектов, а его эффективность не высока.

Основным компонентом кандидатных вакцин против LASV, является высокогликозилированный гликопротеиновый комплекс GPC, представленный на поверхности вириона. Поэтому целью нашего исследования является полу-

чение тримера поверхностного гликопротеина GPC вируса Ласса в эукариотической системе.

Материалы и методы: в состав вектора pVEAL3 была клонирована искусственно синтезированная последовательность, кодирующая белок GPC LASV. Полученной плазмидой pVEAL3-LASSA-TRIM трансфецировали клетки млекопитающих CHO-K1. Клетки млекопитающих позволяют получать целевой белок в наиболее близкой к нативной форме, т.е. прошедший необходимые посттрансляционные модификации, что весьма важно для иммуногенности высокогликозилированных вирусных белков.

Клетки CHO-K1, растили в инкубаторе при 5% содержания CO₂, 80%-ной влажности. При достижении 80% плотности монослоя проводили трансфекцию клеток с помощью Lipofectamine 3000 (ThermoFisher, США) в соответствии с инструкцией производителя. Трансфецировали клетки смесью плазмид pVEAL3-LASSA-TRIM и pCMV(CAT)T7-SB100, взятых в соотношении 1:10. Через 48 часов после трансфекции добавляли селективный антибиотик пурамицин в концентрации 2 мкг/мл. В течении 3-х дней наблюдалось активное отмирание основной массы клеток. На четвертый день клеточный пул был перенесен в 6-луночный культуральный планшет, так же с добавлением селективного антибиотика. Через 2 дня достигался монослой. Полученный пул клеток был криоконсервирован, после чего было проведено клонирование с целью отбора индивидуальных клонов с высокой продукцией. Клонирование выполнялось методом лимитирующих разведений в 96-луночных планшетах. Через 14 суток визуально отбирали лунки, содержащие един-

ственный клон, для которых проводили отбор культуральную жидкость с целью оценки продуктивности клонов при помощи иммуноферментного анализа.

Культуральная жидкость отобранных вариантов моноклонов была проверена методом иммуноферментного анализа на специфическое взаимодействие с моноклональным антителом 37.7H. В качестве отрицательных контролей были использованы человеческие моноклональные антитела: iB20 (специфическое к SARS-CoV-2) и MR191 (специфическое к вирусу Марбург).

Результаты: Для разработки продуцента была выбрана клеточная линия CHO-K1, поскольку экспрессионная система позволяет получать наиболее корректную форму белка, обеспечивая все необходимые этапы посттрансляционной модификации. Для получения культуры-продуцента проведен отбор наиболее продуктивных клонов. Это дополнительно увеличивает выход целевого продукта, поскольку поликлональная клеточная культура содержит клоны с разной способностью к продукции рекомбинантного белка.

Проверка культуральной жидкости отобранных вариантов моноклонов на специфическое взаимодействие с моноклональным антителом 37.7H против LASV выявила, что уровень детектируемого сигнала взаимодействия рекомбинантного белка GPC-LASV с антителом 37.7H равна от 2,7 до 3,4 OD, а с антителами iB20 и MR191 — 0,11 и 0,9 OD, соответственно.

Заключение: полученный рекомбинантный белок GPC-LASV обладает свойствами антигена и проявляет специфическое взаимодействие с моноклональными антителами 37.7H.

ДОЛЯ КОКСИЕЛЛЁЗА СРЕДИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЯВЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С ЛИХОРАДКОЙ НЕЯСНОГО ГЕНЕЗА В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Бондаренко Е.И.¹, Вяжевич А.Н.^{2,3}, Демина О.К.¹, Офицеров В.И.¹, Позднякова Л.Л.³, Краснова Е.И.^{2,3}

¹ АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации, Новосибирск, Россия

³ ГБУЗ Новосибирской области «Городская инфекционная клиническая больница № 1», Новосибирск, Россия

Лихорадка Ку (коксиеллёз) — природно-очаговый антропоозооз с широким спектром клинических проявлений. Заболевание создает реальную угрозу для здоровья и жизни людей. Резервуаром возбудителя коксиеллёза, *Coxiella burnetii*, являются сельскохозяйственные животные, клещи и их прокормители. Среди населения РФ за период с 1957 по 2021 г. было зарегистрировано 13938 случаев лихорадки Ку, а в 2022 г. — 156 заболевших [1]. Однако эта информация не отражает реальных масштабов распространения данного заболевания. Основными причинами гиподиагностики лихорадки Ку в нашей стране являются недостаток диагностических тестов для её верификации, а также низкая информированность врачей об этой болезни, которая часто проходит «под маской» других инфекций.

Цель работы. Комплексное обследование пациентов, поступивших в стационар больницы в лихорадочном состоянии, включающее выявление молекулярно-генетических маркеров возбудителей коксиеллёза и инфекций,

передающихся клещами (ИПК).

Материалы и методы. В ретроспективное обследование вошли 583 больных, поступивших в весенне-летний период 2022 г. в лихорадочном состоянии в Городскую инфекционную клиническую больницу № 1 г. Новосибирска. Для определения генетических маркеров 6 возбудителей ИПК использовали наборы реагентов АО «Вектор-Бест» (Россия). Выявление ДНК *C. burnetii* методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили с использованием экспериментального лабораторного теста как описано нами в работе [2]. Для исследований использовали образцы лейкоцитарной фракции крови (ЛФК) и мочи (Мч), которые получали от пациентов, находящихся в лихорадочном состоянии, как описано ранее [3]. Секвенирование участков ДНК *C. burnetii* по Сенгеру проводили с помощью праймеров, приведенные в работах [2, 4]. Для серологического исследования использовали 2 набора реагентов «*Coxiella burnetii* ELISA IgM» и «*Coxiella burnetii* ELISA IgG» (Vircell, Испания), а также «Имуноферментную

тест-систему «ИФА-анти-Ку-Г» (Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Россия).

Результаты. В ходе ретроспективного исследования в клинических образцах 111 из 583 (19,0 %) пациентов с лихорадкой неясного генеза были обнаружены молекулярно-генетические маркеры 4 основных возбудителей ИПК, циркулирующих на территории Западной Сибири: вируса клещевого энцефалита, иксодового клещевого боррелиоза, клещевого риккетсиоза и клещевой возвратной лихорадки, вызванной *B. miyamotoi*. ДНК возбудителя Ку-лихорадки была выявлена в образцах ЛФК у 7 (1,2 %) больных, в пробах мочи — у 6 (1,2%) пациентов, а в обоих видах этих образцов — в 7 (1,2 %) случаях (таблица). В итоге этого исследования наличие генетического материала *C. burnetii* было определено у 20 из 583 (3,4 %) больных. У 7 пациентов с лихорадкой

отмечена высокая нагрузка ДНК кокциелл в ЛФК (значения Ct варьировали от 26 до 34 цикла) и полная воспроизводимость результатов ПЦР-РВ. Наличие генетического материала возбудителя Ку-лихорадки в этих образцах было подтверждено с помощью секвенирования по фрагментам двух генов: IS1111 и 16S rRNA. Результаты молекулярно-генетического анализа показали, что полученные нуклеотидные последовательности гомологичны между собой и соответствуют последовательностям более двух десятков штаммов *C. burnetii*, циркулирующих в разных регионах земного шара, которые представлены в базе данных GenBank.

Таким образом, в результате проведенного исследования этиология лихорадки была установлена у 131 из 583 (22,5 %) больных, среди которых доля пациентов, инфицированных возбудителем кокциеллёза, составила 15,3 %.

ТАБЛИЦА. ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ *C. BURNETII* В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ БОЛЬНЫХ С ЛИХОРАДКОЙ НЕЯСНОГО ГЕНЕЗА.

№ Пациентов	Предварительный диагноз**	Значения Ct при анализе ПЦР-РВ 2 образцов в 2 повторах***		Результаты исследования с помощью наборов реагентов:		
		ЛФК	Мочи	Coxiella burnetii ELISA (Viracell)		ИФА-анти-Ку-Г (НИИЭМ им. Пастера)
				IgM	IgG	
19*	ОКИ	26, 26, 28, 28	40, ОР, ОР, ОР	+	+	+
21	ВКЭ	ОР, ОР, ОР, ОР	39, ОР, 40, ОР	-	-	+
26*	Иерсиниоз, сепсис	28, 28, 30, 31	35, 37, 37, 40	+	+	+
32	ВКЭ	ОР, ОР, ОР, ОР	40, ОР, 40, ОР	-	-	+
43	Пневмония, COVID	ОР, ОР, ОР, ОР	40, ОР, ОР, 40	-	-	-
45	ВКЭ	39, ОР, ОР, ОР	ОР, ОР, ОР, ОР	-	-	-
53*	ВКЭ, ИКБ, COVID	30, 30, 31, 31	39, 40, ОР, ОР	+	+	+
61*	ВКЭ	28, 28, 29, 29	ОР, ОР, ОР, ОР	+	+	+
80	Пневмония, ОРВИ	38, ОР, ОР, ОР	от, 39, ОР, ОР	-	-	-
102	COVID, ВКЭ	ОР, 38, ОР, ОР	ОР, ОР, ОР, ОР	-	-	-
122	КР	ОР, ОР, ОР, ОР	ОР, ОР, ОР, 39	-	-	+
153	ИКБ	40, ОР, ОР, ОР	ОР, ОР, ОР, ОР	-	-	+
166*	ПИ, ВКЭ	34, 34, 36, 36	ОР, ОР, ОР, ОР	+	+	+
341*	ВКЭ	30, 30, 31, 32	40, ОР, ОР, ОР	-	-	+
375	ВКЭ	40, ОР, ОР, ОР	ОР, 40, ОР, ОР	-	-	+
441	КР	ОР, 40, ОР, ОР	ОР, ОР, ОР, ОР	-	-	+
507*	ВКЭ	29, 29, 30, 30	31, 35, ОР, ОР	-	-	+
517	ВКЭ	ОР, ОР	37, ОР	-	+	-
520	ВКЭ	ОР, ОР	ОР, 36	-	-	+
534	ИКБ	ОР, 39, ОР, ОР	ОР, ОР	-	+	+

* — наличие ДНК *C. burnetii* подтверждено результатами секвенирования фрагментов генов 16S rRNA и IS1111,

** ОКИ — общая кишечная инфекция. ВКЭ — вирусный клещевой энцефалит. ИКБ — иксодовый клещевой боррелиоз, КР — клещевой риккетсиоз; ПИ — пищевая инфекция. *** ОР — отрицательный результат ПЦР-РВ.

Серологические маркеры лихорадки Ку были выявлены у 16 из 20 (80 %) больных с наличием ДНК *S. burnetii* в клинических образцах. При этом в сыворотке крови 3 из них были определены IgM и IgG к антигенам кокциелл, что позволило сделать вывод о недавнем инфицировании этой патогенной бактерией. У 13 пациентов обнаружили только специфические IgG, циркуляция которых в кровотоке, свидетельствует о наличии гуморального иммунитета, который развился в ответ на заражение *S. burnetii*, но не позволяет судить о стадии инфекции. Широкий спектр вариантов предварительного диагноза, поставленного на основании внешних клинических проявлений при поступлении в стационар 20 больным (таблица), у которых при ретроспективном анализе были выявлены маркеры лихорадки Ку, подтверждает, что из-за отсутствия характерных патогномоничных признаков кокциеллёз протекал под маской целого ряда заболеваний, имеющих общий клинический признак — лихорадку

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в весенне-летний период доля кокциеллёза у среди инфекций, вызывающих лихорадку неясного генеза в Новосибирской области, может достигать 15 %. Комплексное обследование больных с применением ИФА и ПЦР-РВ позволяет провести дифференциальную диагно-

стику на ранней стадии лихорадки Ку, предотвратить хронизацию инфекции и развитие серьезных осложнений.

Литература.

1. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Зеликман С.Ю. Анализ заболеваемости лихорадкой Ку в Российской Федерации в период с 1957 по 2019 год. // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 3. С. 141-146.

2. Бондаренко Е.И., Филимонова Е.С., Краснова Е.И., Криницина Э.В., Ткачев С.Е.

Случаи заболевания Ку-лихорадкой, выявленные у жителей Новосибирской области, госпитализированных с подозрением на инфекции, передаваемые клещами. // Клиническая лабораторная диагностика. 2021. Т. 66. №4. С. 227-236.

3. Бондаренко Е.И., Щучинова Л.Д., Тимофеев Д.И. и др. Выявление генетических маркеров возбудителей клещевых риккетсиозов в ПЦР с помощью наборов реагентов «Реал-Бест ДНК Rickettsia species» и «РеалБест ДНК Rickettsia sibirica/Rickettsia heilongjiangensis». // Новости «Вектор-Бест». 2018. № 1 (87). С. 2–10. <https://vector-best.ru/publ/nvb.php>

3. Лубова В.А., Леонова Г.Н., Шутикова А.Л., Бондаренко Е.И. Индикация возбудителя Ку-лихорадки на юге Дальнего Востока. // Клиническая лабораторная диагностика. 2020. Т. 65. №11. С. 720-728.

АНАЛИЗ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ *DERMACENTOR RETICULATUS* ПАТОГЕННЫМИ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА РИККЕТСИЯМИ В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Воронкова О.В.¹, Романенко В.Н.², Симакова А.В.², Есимова И.Е.¹, Мотлохова Е.А.¹, Чернышов Н.А.¹, Хасанова Р.Р.¹

¹ ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

² ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

Актуальность. Иксодовые клещи имеют большое значение как переносчики возбудителей ряда опасных заболеваний человека: клещевого энцефалита, иксодового клещевого боррелиоза, клещевых риккетсиозов, туляремии и др. Наряду с *Ixodes persulcatus* (таёжный клещ) в таёжных регионах Западной Сибири часто стали регистрироваться высокочисленные популяции иксодовых клещей *Dermacentor reticulatus* (луговой клещ). При этом данные территории не являются их традиционным местом обитания в отличие от лесостепных и степных зон Европейской части России и юга Сибири. Поскольку существует опасность распространения клещей вида *D. reticulatus* на новые экологически благоприятные для него территории, важной задачей является анализ спектра и характера их зараженности возбудителями инфекционных заболеваний в зависимости от биотопической и ландшафтной приуроченности переносчика.

На территории Томской области *D. reticulatus* впервые был обнаружен в 2005 году и только в единичных экземплярах. С 2015 года численность лугового клеща в природных биотопах Томской области ежегодно увеличивается. Инфекции, передаваемые иксодовыми клещами, являются важной медицинской проблемой в связи с ши-

роким распространением и многообразием клинических проявлений. На территории Западной Сибири именно клещами преимущественно из рода *Dermacentor* человеку передается основной возбудитель сибирского клещевого тифа *Rickettsia sibirica*. Сибирский клещевой тиф — это облигатно-трансмиссивная природно-очаговая инфекция, которая занимает ведущее место по уровню заболеваемости среди клещевых риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки в России. Сибирский клещевой тиф характеризуется относительно благоприятным прогнозом исхода заболевания, но по массовости поражения людей в отдельных административных районах нередко эта инфекция не уступает клещевому энцефалиту.

Цель исследования — провести анализ моно- и микст-зараженности иксодовых клещей *D. reticulatus*, обитающих в урбанизированных биотопах Томской области, патогенными риккетсиями.

Материалы и методы. В августе и сентябре 2020 и 2021 г.г. был осуществлен сбор клещей в лесопарковых зонах южной части г. Томска (террасы Лагерного сада, район Южного кладбища, придомовые территории и хозяйственные постройки по ул. Континентальная). Принадлежность

клетей к виду *Dermacentor reticulatus* определяли методами морфометрии. Нуклеиновые кислоты выделяли из гомогенатов тканей клеща с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Для исследования образцов нуклеиновых кислот использовали наборы «Реал-Бест» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск): «РеалБест РНК ВКЭ», «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l.», «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*»; «РеалБест ДНК *Babesia species*»; «РеалБест ДНК *Rickettsia species*»; «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis*». Постановку ПЦР осуществляли на амплификаторе DPlite4 с детекцией результатов в режиме реального времени (ООО «ДНК-Технология», Москва). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft®Office Excel 2010. Результаты выражали в виде частоты встречаемости признака в выборке с расчетом 95% доверительного интервала (ДИ) по методу Уилсона.

Основные результаты. Было исследовано 184 индивидуальных образца нуклеиновых кислот, полученных из гомогенатов имаго *D. reticulatus* обоего пола. В 43 образцах

(23,37% (ДИ: 5,53-53,36)) были выявлены генетические маркеры патогенных риккетсий: в тканях 16 самцов и 27 самок. Большинство выявленных случаев микст-инфицирования являлись ассоциациями риккетсий (88,24%), а именно, с патогенными боррелиями (23,52% (ДИ: 6,58-68,68)), бабезиями (52,94% (ДИ: 30,96-73,83)) и ВКЭ (5,88% (ДИ: 1,05-26,98)). Двойное инфицирование зарегистрировано в 94% случаев от общего числа микст-вариантов. В одном образце были обнаружены одновременно маркеры четырех возбудителей клещевых инфекций — ДНК *Rickettsia species*, ДНК *Babesia species*, ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l. и РНК ВКЭ. Общая частота сочетанного инфицирования *D. reticulatus* по результатам наших исследований составила 12,88% (17 из 184 образцов).

Выводы. Иксодовые клещи вида *D. reticulatus*, обитающие в урбанизированных биотопах Томской области, вовлечены в трансмиссию патогенных риккетсий. Выявление возбудителя группы риккетсиозов в организме клеща-переносчика свидетельствует о циркуляции данного вида патогенных бактерий, а также о значимой эпидемиологической роли луговых клещей в их трансмиссии на территории Томской области.

ВЫЯВЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *R66* У ИЗОЛЯТОВ ОТ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ – РЕЗЕРВУАРНЫХ ХОЗЯЕВ *BORRELIA BAVARIENSIS*

Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б.

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), г. Москва, Россия

Введение. Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) — группа природноочаговых облигатно-трансмиссивных инфекций, передающихся клещами и вызывающих полисистемные поражения. Их возбудители — несколько видов боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*, из которых в России, кроме *B. garinii* и *B. afzelii*, первостепенное значение, как показали недавние исследования (Голидонова и др., 2021), имеют широко распространённые паразитарные системы *B. bavariensis*. По уровню заболеваемости ИКБ лидируют среди природноочаговых нозологических форм (Рудакова и др., 2023).

Один из факторов патогенности *B. bavariensis* — белок R66, кодируемый одноименным геном, участвует в адгезии возбудителя к клеткам млекопитающих при их инфицировании (Coburn et al., 2022). Исследования нуклеотидных последовательностей локуса гена *r66* у изолятов *B. bavariensis*, полученные в Пермском крае от больных ИКБ, показали наличие среди них как минимум 3-х аллельных вариантов этого гена (Golidonova et al., 2022). В этом регионе подавляющее большинство заражений населения возбудителем ИКБ происходит в результате нападения голодных инфицированных имаго единственного здесь переносчика боррелий — таежного клеща (*Ixodes persulcatus*). Переносчик получает эти спирохеты только путем трансфазовой передачи от успешно напитавшихся и перелинявших в имаго нимф, которые инфицируются при паразитировании на

хозяевах ряда видов или трансфазовой передачей при перелинивании напитавшихся личинок в нимф. В природных очагах ИКБ описываемого региона основной прокормитель личинок и большей части нимф таежного клеща, а также основной резервуарный хозяин боррелий — рыжая полевка (*Myodes glareolus*), а один из более значимых дополнительных хозяев — полевка-экономка (*Alexandromys oeconomus*) (Korenberg et al., 2002 Ковалевский и др., 2004).

Цель и задачи. Цель: выявление вариативности нуклеотидных последовательностей локусов гена *r66* и частоты встречаемости различных аллельных вариантов *B. bavariensis*, циркулирующих в природном очаге среди основных и дополнительных резервуарных хозяев, для дальнейшего сравнения полученных результатов с таковыми у изолятов от больных ИКБ и определения источника наиболее патогенных вариантов возбудителя. Задача: анализ аллельных вариантов гена *r66* у изолятов *B. bavariensis* от двух разных видов резервуарных хозяев этого возбудителя.

Материалы и методы. Исследованы 57 первичных изолятов *B. bavariensis* из музея боррелий лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи». Они получены путём посева на среду BSK биопсийных проб ушной кожи или (и) материала из мочевого пузыря 43 рыжих полевок, а также 14 полевок-экономок (Горелова и др., 2001). Отлов полевок проведен в природном очаге того же региона, как и изоляты боррелий этого вида от людей больных

ИКБ, исследованные ранее (Golidonova et al., 2022). Выделение ДНК и очистку полученных ПЦР-продуктов проводили коммерческими наборами «ПРОБА-НК» (ДНК-технология, Москва) и HiPure Gel DNA Mini Kit (Magen, China). Праймеры, фланкировавшие локус длиной 280 п. н. гена *r66*, и условия ПЦР приведены ранее (Golidonova et al., 2022). Ампликоны секвенированы с помощью набора реактивов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific, USA) на автоматическом секвенаторе 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) в Межинститутском Центре коллективного пользования «Геном» (ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва). Анализ полученных результатов проведен с использованием платформы BLAST, программ Chromas, BioEdit и MEGA11.

Результаты. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *r66* 57 изолятов от рыжих полевок и полевок-экономок показал их сходство на 97,1-100% с евразийской подгруппой *B. bavariensis* SZ. С типовым штаммом PVi европейской подгруппы *B. bavariensis* сиквенсы исследованных нами изолятов оказались сходными всего на 95,4-96,4%, а от сиквенсов гена *r66* типовых штаммов других патогенных видов *B. burgdorferi sensu lato* отличались на 7,2-13,4%.

На дендрограмме, построенной методом максимального правдоподобия, нуклеотидные последовательности исследованных изолятов группировались в один большой кластер с евразийским штаммом *B. bavariensis* SZ, европейским PVi и *B. garinii* 20047T, а внутри него образовывали несколько более мелких кластеров. Они позволили предположить наличие как минимум 7 аллельных вариантов гена *r66* у изолятов боррелий, выделенных от двух видов полевок. Наличие дополнительно еще 4-х возможных аллельных вариантов уточняется. Сходство между нуклеотидными последовательностями внутри каждого аллельного варианта

составило 98,9-100%, а отличия между ними — не более 3,2%. К одному из аллельных вариантов отнесены тождественные сиквенсы значительной части изолятов (23 из 57), а к каждому из 6 остальных вариантов — последовательности от 1 до 9 изолятов. Все эти варианты отличаются друг от друга 20 нуклеотидными заменами, а в аминокислотном выражении — 10 заменами. Аминокислотным выравниванием обнаружен варибельный участок, состоящий из 25 аминокислот, в котором произошли эти замены. Две из них заключались в замещении полярных аминокислот на неполярные, а 4 в обратной замене; 4 замены аминокислот не повлияли на смену полярности. Эти аминокислотные замены, или некоторые из них, вероятно, могут влиять на структуру белка *R66* и, следовательно, на степень патогенности возбудителя ИКБ, заражающего человека. У разных видов полевок наблюдаются некоторые отличия в частоте встречаемости различных аллельных вариантов гена *r66*. Два из семи выявленных аллельных вариантов у изолятов боррелий от мышевидных грызунов оказались на 97,9-100% сходными с таковыми у изолятов от пациентов с ИКБ.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствуют о значительной варибельности нуклеотидных последовательностей локусов гена *r66* *B. bavariensis* у мышевидных грызунов — основных и (или) дополнительных прокормителей предимагинальных стадий развития таежных клещей. Эта гетерогенность вероятно возникает в процессе адаптации боррелий к видовым особенностям организма их различных естественных резервуарных хозяев и связана со сложным многолетним циклом развития иксодовых клещей, который происходит со сменой хозяев — прокормителей. Аллельные варианты гена *r66* значительной части изолятов *B. bavariensis*, представленные в данном сообщении, имеют аналогичные аминокислотные замены с большинством изолятов от людей больных ИКБ.

ДЕСЯТИЛЕТНИЙ МОНИТОРИНГ СОЧЕТАННЫХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, В ПРИБАЙКАЛЬЕ

Мельникова О.В.¹, Лопатовская К.В.¹, Трушина Ю.Н.¹, Адельшин Р.В.^{1,2}, Якович Н.В.¹, Андаев Е.И.¹

¹ ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск, Россия

² ФГБОУВО «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия.

Актуальность. На территории Прибайкалья существуют сочетанные природные очаги клещевого энцефалита (КЭ), иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), моноцитарного эр-лихиоза человека (МЭЧ) и гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), основным переносчиком которых в Восточной Сибири является таежный клещ — *Ixodes persulcatus*. Изучение современного состояния природных очагов и их мониторинг необходим для обеспечения эпидемиологического благополучия населения.

Цель и задачи. С помощью мультиплексной ПЦР оценить зараженность иксодовых клещей, собранных в сочетанных природных очагах, на спектр патогенов, выявить тенденции многолетней динамики инфицирован-

ности переносчиков и территории наибольшего риска заражения.

Материалы и методы. Голодных таежных клещей *I. persulcatus* собирали на флаг в течение 10 сезонов в Иркутском, Жигаловском, Слюдянском, Шелеховском Эхирит-Булагатском районах Иркутской области, а также Кабанском и Тункинском районах Республики Бурятия. Членистоногих исследовали индивидуально (n=4706), приготавливая из них суспензию на физиологическом растворе (по 0,5 мл на одного клеща). РНК/ДНК выделяли, используя комплект реагентов «РИБО-преп», обратную транскрипцию проводили, используя ком-плект «РЕВЕРТА-Л». Маркеры вируса КЭ, ИКБ, возбудителей МЭЧ и ГАЧ выявляли в ПЦР с помощью набора

реагентов «АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) в реальном времени. Результаты учитывали на термоциклере C1000TM Bio-Rad CFX96TM (США). ПЦР-продукт гена E ВКЭ получали с помощью набора реагентов ПЦР-РВ («Син-тол», Москва) и праймеров, [Adelshin et al., 2015]. Для определения видовой принадлежности боррелий использованы праймеры, фланкирующие фрагмент гена 16S рРНК длиной 650 п. н. Полученные ПЦР-продукты визуализировали в 1% агарозе. Секвенирование ПЦР-продуктов проводили с использованием набора реактивов ABI Prism BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit на приборе Genetic Analyzer 3500 xL (Applied Biosystems). Анализ и выравнивание нуклеотидной последовательности проводили в программе BioEdit v. 7.0.5.3 [Hall, 1999]. Филогенетическое NJ-дерево строили с помощью программы MEGA 5 [Tamura et al., 2011].

Результаты. В течение исследуемого периода доля таёжных клещей, содержащих генетический материал искомым возбудителей, колебалась как по годам, так и по обследуемым участкам. Хотя бы один патоген присутствовал в половине исследованных клещей. Реже всего выявляли РНК ВКЭ (в среднем в 2,3 % от исследованных проб), чуть чаще обнаруживали ДНК возбудителей МЭЧ (7,6%) и ГАЧ (12,1%). Бактерии группы *B. burgdorferi* s.l. оказались самыми распространенными из определяемой группы возбудителей (44,3%). 12,9% суспензий содержали генетический материал от двух до четырёх патогенов в 10 разных сочетаниях, самыми распространенными из которых были анаплазмы+боррелии и эр-лихии+боррелии (47,2 и 30,5% от всех «микстов» соответственно). Многолетние изменения вирусофорности и бактериофорности *I. persulcatus* у разных возбудителей отличались и по всем бактериальным инфекциям имели тенденцию к росту (таблица).

ТАБЛИЦА. ВИРУСОФОРНОСТЬ И БАКТЕРИОФОРНОСТЬ ТАЁЖНОГО КЛЕЩА В СОЧЕТАННЫХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ПРИ-БАЙКАЛЬЯ (2013-2022 ГГ.)

Годы	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>B. burgdorferi</i> sl	<i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i>	Вирус клещевого энцефалита
2013	11,1±1,97	36,8±3,03	7,9±1,70	3,6±1,16
2014	7,5±1,20	38,4±2,29	5,8±1,07	1,9±0,62
2015	9,1±1,44	30,9±2,32	4,8±1,07	3,1±0,96
2016	11,1±1,82	31,5±2,69	5,4±1,31	1,7±0,74
2017	13,6±1,70	39,5±2,45	2,9±0,84	3,7±0,93
2018	10,5±1,48	37,0±2,33	4,0±0,94	1,2±0,52
2019	14,6±1,46	54,8±2,06	8,9±1,18	3,7±0,79
2020	7,3±1,07	47,7±2,04	5,7±0,95	0,5±0,29
2021	16,6±1,31	50,1±1,76	11,5±1,12	3,4±0,65
2022	15,5±1,70	57,7±2,32	15,0±1,68	0,5±0,33
В целом	12,1±0,48	44,3±0,73	7,6±0,39	2,3±0,22

Сезонное выявление маркеров эрлихий достигает максимальных значений в конце мая — начале июня — на пике активности переносчика. Выявляемость ВКЭ, анаплазм и боррелий статистически достоверно возрастает к концу сезона ($P<0,05$ для ВКЭ и боррелий и $P<0,001$ для анаплазм).

Территориально наибольшую опасность с точки зрения риска заражения всеми детек-тируемыми возбудителями представляют окрестности пос. Большие Коты (Иркутский рай-он Иркутской области), расположенного на юго-западном берегу Байкала, (сухопутная транспортная связь с посёлком отсутствует). Наиболее эпидемиологически значимые патогены (ВКЭ и боррелии) встречаются также значительно чаще среднего ($P<0,001$) в горно-таёжной зоне соседних районов: Слюдянского Иркутской области и Кабанского — Республики Бурятии. Эти территории, расположенные вдоль юго-восточного побережья оз. Байкал, являются популярными туристическими и рекреационными направлениями, и контакты с клещами как местного населения, так и приезжих здесь достаточно часты. Инфицированность *I. persulcatus* ВКЭ в Слюдянском районе

составляет 7,5±1,44%, а боррелиями в Ка-банском районе — 58,3±3,30%.

Секвенирование изолятов РНК ВКЭ за эти годы ($n=151$) по гену E показало, что все они относятся к сибирскому субтипу, группам «Васильченко» и «Заусаев» (74,8 и 25,2% соответственно). В суспензиях клещей удалось идентифицировать три вида патогенных боррелий — *B. garinii*, *B. afzelii* и *B. miyamotoi* (65,5, 21,2 и 13,3 % соответственно от числа секвенированных проб), обуславливающих различные формы заболеваний ИКБ в Прибайкалье.

Выводы. Многолетняя динамика инфицированности клещей анаплазмами, боррелиями и эрлихиями в сочтаных очагах Прибайкалья имеет тенденцию к росту. Территориально риск заражения наиболее эпидемиологически опасными из исследуемых патогенов выше всего на популярных туристических направлениях Слюдянского района Иркутской области и Кабанского района Республики Бурятии, расположенных на юго-восточном побережье Байкала, а также в окрестностях п. Большие Коты на противоположном побережье южной акватории.

СЕГМЕНТИРОВАННЫЕ ФЛАВИПОДОБНЫЕ ВИРУСЫ, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Холодиль И.С.¹, Белова О.А.¹, Морозкин Е.С.², Литов А.Г.¹, Макенов М.Т.², Журенкова О.Б.², Карань Л.С.², Карганова Г.Г.¹

¹ ФГАНУ «Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), 108819, г. Москва, пос.Московский, пос. Института полиомиелита, д. 8, кор. 1

² ФБУН Центральный Научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д.3а.

Род *Flavivirus* помимо классических flavириусов включает родственные неклассифицированные сегментированные флавиподобные вирусы, два сегмента которых имеют гомологию с флавириусной РНК-зависимой РНК-полимеразой и РНК-хеликазы-протеазой. Вирусы объединены в группу Джингмен, в которую входят вирус Джингмен, вирус Алонгшан, вирус Янгоу и другие. Этой группе в настоящее время уделяется повышенное внимание, так как изучение этой группы дает новые сведения о многообразии возможностей организации генома у РНК(+) вирусов и их эволюции, а неопределенность круга хозяев и вирулентности для человека и животных требует изучения эпидемиологического потенциала этой группы.

Целью нашей работы было описание распространения вирусов этой группы в России и их филогенетических взаимоотношений.

Нами были исследованы клещи и комары, собранные в различных регионах России, на наличие РНК флавиподобных вирусов с использованием праймеров для рода *Flavivirus* и специфических праймеров для вирусов Алонгшан и Янгоу.

Мы обнаружили вирус Янгоу в клещах *Dermacentor nuttalli*, *D. marginatus*, *D. reticulatus* и *I. persulcatus* в трех регионах России. Распространенность вируса колебалась от 0,3% до 14,2%. Нами обнаружены ампликоны вируса Алонгшан в 44 пробах различных видов клещей в восьми

регионах России. Распространенность вируса колебалась от 0,6% до 7,8%, что соответствует или даже выше, чем распространенность вируса клещевого энцефалита. Мы продемонстрировали успешное воспроизведение вирусов Алонгшан и Янгоу в клеточных линиях клещей IRE/CTVM19 и HAE/CTVM8 без цитопатического эффекта.

Согласно филогенетическому анализу штаммы вируса Алонгшан были разделены на две группы: группу *Ixodes persulcatus* и группу *Ixodes ricinus*. Кроме того, группа *I. persulcatus* разделилась на европейскую и азиатскую подгруппы. Мы обнаружили аминокислотные замены, характерные для групп *I. ricinus* и *I. persulcatus*, а также для европейской и азиатской подгрупп группы *I. persulcatus*.

Оценки эволюционного расхождения между всеми полными последовательностями белков VP1a и VP1b вируса Янгоу (из Китая и России) показали большее расхождение в нуклеотидных последовательностях VP1b, чем у VP1a, а средние расхождения составили 3,05% и 1,85% соответственно. Однако большее расхождение в аминокислотных последовательностях наблюдалось в VP1a, чем в VP1b, а средние расхождения составили 1,05% и 0,60% соответственно.

Таким образом, мы впервые показали широкую циркуляцию вирусов Янгоу и Алонгшан на территории России.

Работа поддержана грантом РНФ №21-14-00245.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА E ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БУРЯТИЯ

Лопатовская К.В., Бондарюк А.Н., Мельникова О.В., Андаев Е.И.

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск, Россия

Введение. Клещевой энцефалит (КЭ) является эпидемически значимой природно-очаговой вирусной инфекцией лесной зоны Евразийского континента. В Республике Бурятия описана циркуляция как минимум четырёх субтипов ВКЭ: европейского, дальневосточного, Байкальского и сибирского. На данной территории преобладает сибирский субтип и наблюдаются различные формы заболевания. Известно, что сибирский субтип ВКЭ является наиболее вариабельным и границы внутрисубтипной изменчивости у него находятся близко к границам разделенности субтипов (уровень сходства по нуклеотидной последовательности 88%). С.Е. Ткачёвым с соавт. описано пять линий сибирского субтипа: Балтийская, Обская, Боснийская, Васильченко и Заусаев, при этом последняя является наиболее распространённой.

Цель. Провести молекулярно-генетический и филогенетический анализ 31 последовательности гена E изолятов ВКЭ, выделенных из иксодовых клещей в 2021 г. в Кабанском районе Республики Бурятия.

Материалы и методы. Иксодовых клещей собирали на флаг во второй декаде июня 2021 г. на участках, расположенных вдоль побережья Байкала по ходу федеральной

автодороги Р258 «Байкал» (поймы рек Осиновка, Быстрая, Мишиха, Переёмная, Большая Ивановка, окр. г. Бабушкина, пп. Танхой, Горный и Боярский). Выделение вирусной РНК из суспензий проводили с помощью набора «РИБО-преп» (Амплисенс, Москва). Обратную транскрипцию проводили при помощи набора реагентов «РЕВЕРТА-L-100» (ЦНИ-ИЭ Роспотребнадзора РФ, Москва). ПЦР-продукт получали с помощью набора реагентов ПЦР-РВ («Синтол», Москва) и праймеров. Полученные ПЦР-продукты секвенировали с использованием набора реактивов ABI Prism BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit на приборе Genetic Analyzer 3500 xL (Applied Biosystems). Анализ и выравнивание нуклеотидной последовательности проводили в программе BioEdit v. 7.0.5.3. Для проведения филогенетического анализа методом максимального правдоподобия (ML) использовали программу IQTREEv.1.6.12. Наиболее оптимальную модель нуклеотидных замен выбирали на основе значений байесовского информационного критерия (BIC), рассчитанных при помощи алгоритма ModelFinder, реализованного в IQTREE. Поддержку клад оценивали методом непараметрического бутстрепа (БС) с количеством реплик равным 500. Всего в анализе использовали 31 нуклеотидную последовательность, кодирующую белок E и начало белка NS1 (средняя длина последовательности — 1712 н.о.).

Результаты. Генотипирование 31 изолята ВКЭ по гену E и фрагменту гена NS1 показало, что все они относятся к сибирскому субтипу с преобладанием генолинии Васильченко. В нашем исследовании из 31 изолята к линии Заусаев отнесён только один, остальные принадлежат к линии Васильченко (номера доступа в Международной базе GenBank OM 919464 — OM 919493). Это может быть связано с тем, что ВКЭ демонстрирует генетическую вариабельность, которая часто коррелирует с географическим происхождением. Ярким проявлением данной особенности вируса явилось чёткое разделение на филогенетическом дереве изолятов, полученных в данной работе, по участ-

кам, максимально отдалённым друг от друга расстоянием и изрезанностью рельефа. Филогенетический анализ показал, что изоляты с двух наиболее географически удалённых друг от друга участков (п. Горный и р. Осиновка), сформировали на дереве два монофилетических кластера.

Сравнительный анализ аминокислотных замен показал, что у группы изолятов с участка сбора р. Осиновка, с участка р. Быстрая и у двух изолятов «Bur_Tankhoy_2667-21», «Bur_Pereemnaya_3527-21» имеется характерная для генолинии Васильченко аминокислота V, а у остальных изолятов в данной позиции аминокислотная замена V399→A (как и у прототипа генолинии Заусаев). Можно сделать вывод, что по аминокислотным заменам изоляты «Bur_Tankhoy_2667-21», «Bur_Pereemnaya_3527-21» более близки к изолятам с р. Осиновка и р. Быстрая. Группа изолятов с участка сбора п. Горный имеет а.к. замены G410→H, I638→V, K688→R относительно Васильченко. Аминокислотные последовательности изолятов с р. Осиновка и р. Быстрая наиболее гомологичны прототипному штамму Васильченко. А изоляты с участка сбора п. Горный имеют наибольшее количество замен относительно штамма Васильченко.

Выводы.

1. Генотипирование 31 изолята ВКЭ по участку гена E показало, что все они относятся к сибирскому субтипу с абсолютным преобладанием генолинии Васильченко.

2. Изоляты ВКЭ с двух наиболее географически удалённых друг от друга участков (п. Горный и р. Осиновка), сформировали на дереве два монофилетических кластера, что говорит о высокой степени генетической дифференциации данных групп.

3. Аминокислотные последовательности изолятов с р. Осиновка и р. Быстрая наиболее гомологичны прототипному штамму Васильченко. А изоляты с участка сбора п. Горный имеют наибольшее количество замен относительно штамма Васильченко.

ПАТОЛОГИЯ ЭУТОПИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИЯ У ЖЕНЩИН С СУПЕРИНВАЗИОННЫМ ОПИСТОРХОЗОМ: ЖЕЛЕЗИСТАЯ ГИПЕРПЛАЗИЯ

Хадиева Е.Д.^{1,2}, Брынза Н.С.³, Бычков В.Г.³, Морозов Е.Н.⁴, Мишагин В.П.³, Лазарев С.Д.³, Платицина О.В.^{3,5}

¹ БУВО ХМАО–Югры «Ханты–Мансийская государственная медицинская академия», Россия, г. Ханты–Мансийск

² БУ ХМАО–Югры «Окружная клиническая больница», Россия, г. Ханты–Мансийск

³ ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России, г. Тюмень

⁴ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва

⁵ ГАУЗ ТО «МКМЦ «Медицинский город», Патологоанатомическое бюро, Россия, Тюмень

Введение. Железистая гиперплазия эндометрия (ЖГЭ) — это патологическое разрастание железистых структур с одновременным уменьшением стромального компонента. В современной литературе приводятся сведения о классификации, патологии и диагностики железистой гиперплазии эндометрия (Чистякова Г.Н. с соавт., 2018; Ерофеева Л.Г. с соавт., 2022 и др.). В клинической практике наиболее часто используются следующие варианты железистой гиперплазии эндометрия: простая и сложная; железистая гиперплазия без атипии, ЖГЭ с атипией и др. Ранее

установлено, что у женщин с суперинвазионным описторхозом (СО) наблюдается нарушение гормонального статуса с изменением показателей эстрогенов и прогестерона. В предыдущих исследованиях нами были представлены схемы гормональных нарушений и, как следствие, их проявления: эндометриоз, рак и лейомиома (Бычков В.Г. с соавт., 2019, 2022; Хадиева Е.Д. с соавт., 2023). Дальнейшее изучение патологии позволило выявить некоторые новые аспекты патогенеза структурных преобразований в матке при СО — железистой гиперплазии.

Цель: выявить комплекс патогенетических механизмов развития железистой гиперплазии эндометрия у женщин с суперинвазивным описторхозом в зависимости от состояния гормонального статуса.

Материал и методы. Проведён анализ медицинской документации и операционного материала (соскобы эндометрия) у 78 женщин с СО, постоянно проживающих в гиперэндемичном очаге описторхоза. Средний возраст пациенток составил $42,8 \pm 3,5$ лет. Ткани эндометрия окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим, по Ван Гизону. ИГХ-исследование проводили на аппарате иммуногистостейнере Ventana Bench Mark XT. Протокол исследований включал депарафинацию и демаскировку. ИГХ-реакции выполнялись с применением набора системы детекции Ultra Visions Universal DAB с окрашиванием иммунных комплексов хромогеном DAB. Использовали моноклональные мышиные антитела к CD31, CD34, Oct4, CD117, Ki67 Clone MiB-1 (DAKO), разведение 1:100; моноклональные мышиные антитела Progesteron Clone SP1 (Spring), разведение 1:200; моноклональные мышиные антитела Progesteron Clone SP2 (Spring), разведение 1:200; моноклональные мышиные антитела Progesteron Receptor Clone SP2, разведение 1:100. Уровень половых гормонов (эстрогены и прогестерон) выявляли методами газовой хроматографии — масс — спектрометрии и ECLIA. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Statistica 6.0, достоверность результатов оценивали с помощью критерия Стьюдента.

Результаты. Биохимическое исследование показало, что при СО у женщин в I фазе (фолликулярной) наблюдалось повышение эстрогенов на 33,71%, прогестерона — на 20,3 %. Во II группе при гиперэстрогенизме в I фазе выявлено снижение прогестерона на 17,6 %, во II фазе — на 7,7 %.

Результаты морфологического исследования можно разделить на 3 группы:

1. Железистая гиперплазия эндометрия при повышенном уровне эстрогенов и прогестерона в фолликулярную фазу (на 33,71 %, 17,6 %, соответственно).

2. Железистая гиперплазия эндометрия — при гиперэстрогенизме со снижением уровня прогестерона.

3. Железистая гиперплазия эндометрия — при нормальном содержании в крови эстрогенов и прогестерона.

Морфологическая картина ЖГЭ существенно не различалась в 1 и 2 группах, однако, в 2 группе наблюдалось усиление пролиферативных реакций, наблюдался феномен «железа в железе», расположение желёз «спина к спине», снижение секреторной активности, уменьшение площади стромы, у пациенток выявлено утолщение железистого слоя слизистой.

В эндометрии пациенток с нормальными показателями гормонов (III группа) отмечалась ЖГ по типу сложной гиперплазии без атипии: наряду с мелкими железами формировались кистозно расширенные структуры, что свидетельствует о перманентном сигналинге секрета, эндометаболитов *Opisthorchis felineus*, стволовым клеткам эндометрия, их пролиферации и дифференцировке.

Таким образом, при СО у женщин наблюдаются: простая железистая гиперплазия — железы преобладают над стромой, структура желёз отличается от нормы, они диффузно структурированы; сложная ЖГ — структуры желёз отличаются от нормы, они локально структурированы, встречается железисто-кистозная гиперплазия.

Заключение. Установлено, что при хронической описторхозной инвазии с повторными заражениями имеет место нарушение гормонального статуса женщин с последующим развитием железистой гиперплазии простой и сложной без атипии. Кроме того, выявлено прямое влияние секрета паразита на стволовые клетки эндометрия с последующей пролиферацией, дифференцировкой и формированием железистой гиперплазии.

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГУМАНИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛА, НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО ВИРУС ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА

Несмеянова В.С., Исаева А.А., Протопопова Е.В., Святченко В.А., Шаньшин Д. В., Волосникова Е.А., Есина Т. И., Локтев В. Б., Щербаков Д.Н.

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, НСО, р.п. Кольцово

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) — трансмиссивное инфекционное заболевание, возбудитель которого вирус Западного Нила (ВЗН) входит в состав семейства *Flaviviridae*. Для территории Российской Федерации ЛЗН давно перешла из разряда редко встречающихся инфекционных заболеваний в разряд широко распространенных. По данным, публикуемым управлением Роспотребнадзора, эпидемический процесс ЛЗН активизировался с 2018 года. Особой тенденцией эпидемических сезонов последних пяти лет является всё большее территориальное распределение случаев заболеваний, а также вовле-

чение в эпидемический процесс новых регионов, свидетельствующее о продолжающемся расширении ареала ЛЗН. При легком протекании ЛЗН используют симптоматическое лечение. При тяжелом протекании ЛЗН необходима интенсивная терапия с последующей физиотерапией и реабилитацией. В настоящее время не существует специфического противовирусного лечения ЛЗН. Разрабатываются экспериментальные методы лечения такие как: применение интерферона (IFN) α -2b, рибавирина, внутривенное введение гипериммунной плазмы или очищенных иммуноглобулинов, специфичных для ВЗН ней-

трализирующих моноклональных антител, кортикостероидов и антисмысловых олигомеров. Среди перечисленных методов лечения большим потенциалом обладает введение нейтрализующих моноклональных антител из-за их высокой специфичности и безопасности.

Цель работы — охарактеризовать иммунохимические свойства гуманизованного антитела, нейтрализующего ВЗН.

Первый этап работы состоял в получении антигенов, содержащих фрагменты полипротеина ВЗН. Основной мишенью протективных антител против флавивирусов является поверхностный белок Е. В ряде исследований показано, что основным регионом белка Е, на который вырабатываются нейтрализующие антитела является домен III (DIII). Для подтверждения того, что исследуемое антитело реактивно в отношении данного региона, было решено использовать рекомбинантные антигены. Для этого были сконструированы две рекомбинантные плазмиды. Первая рекомбинантная плазида рЕТ32-WNE-187 содержала последовательность, кодирующую фрагмент слитых доменов I и II (DI и DII) поверхностного белка Е. Вторая рекомбинантная плазида рЕТ32-WNV-DIII содержала последовательность, кодирующую фрагмент DIII поверхностного белка Е. С помощью плазмид были получены 2 штамма-продуцента BL21(DE3)-WNV-187 и BL21(DE3)-WNV-DIII. После оптимизации протоколов культивирования и хроматографической очистки конечный выход продукта в среднем составил 30-35 мг рекомбинантного белка с 1 л культуры.

Второй этап работы состоял в получении штамма рекомбинантной клеточной линии CHO-K1-900, продуцирующей гуманизованное антитело 900. После оптимизации протоколов культивирования и хроматографической очистки конечный выход продукта составил в среднем 200 мг с 1 л культуры.

На третьем этапе проведен анализ иммунохимических свойств антитела 900. Показано взаимодействие гуманизованного антитела 900 в разведении 1/177 143 с доменом DIII белка Е ВЗН. Взаимодействие гуманизованного антитела 900 с слитыми DI и DII поверхностного белка Е не выявлено. Иммуноферментный анализ взаимодействия моноклонального гуманизованного антитела 900 с инактивированным ВЗН (шт. LEIV-Vlg00-27924-human) показал, что антитело может связываться с антигеном в разведении 1/218 700. Чтобы окончательно убедиться в функциональной активности полученного гуманизованного антитела 900 проведен анализ нейтрализующей активности антитела на культуре клеток Vero. По результатам эксперимента антитело 900 способно нейтрализовать ВЗН шт. LEIV-Vlg00-27924-human (Vlg-27924) в разведении 1/8100.

Из вышеприведенных данных, можно сделать вывод, что полученное гуманизованное антитело способно нейтрализовать ВЗН. При этом выяснено, что это антитело взаимодействует с доменом DIII поверхностного белка Е ВЗН.

СЕГМЕНТИРОВАННЫЕ ФЛАВИПОДОБНЫЕ ВИРУСЫ, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Холодильов И.С.¹, Белова О.А.¹, Морозкин Е.С.², Литов А.Г.¹, Макенов М.Т.², Журенкова О.Б.², Карань Л.С.², Карганова Г.Г.¹

¹ ФГАНУ «Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), 108819, г. Москва, пос.Московский, пос. Института полиомиелита, д. 8, кор. 1

² ФБУН Центральный Научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д.3а.

Род Flavivirus помимо классических флавивирусов включает родственные неклассифицированные сегментированные флавиподобные вирусы, два сегмента которых имеют гомологию с флавивирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой и РНК-хеликазы-протеазой. Вирусы объединены в группу Джингмен, в которую входят вирус Джингмен, вирус Алонгшан, вирус Янгоу и другие. Этой группе в настоящее время уделяется повышенное внимание, так как изучение этой группы дает новые сведения о многообразии возможностей организации генома у РНК(+) вирусов и их эволюции, а неопределенность круга хозяев и вирулентности для человека и животных требует изучения эпидемиологического потенциала этой группы.

Целью нашей работы было описание распространения вирусов этой группы в России и их филогенетических взаимоотношений.

Нами были исследованы клещи и комары, собранные в различных регионах России, на наличие РНК флавиподобных вирусов с использованием праймеров для рода Flavivirus и специфических праймеров для вирусов Алонгшан и Янгоу.

Мы обнаружили вирус Янгоу в клещах *Dermacentor nuttalli*, *D. marginatus*, *D. reticulatus* и *I. persulcatus* в трех регионах России. Распространенность вируса колебалась от 0,3% до 14,2%. Нами обнаружены ампликоны вируса Алонгшан в 44 пробах различных видов клещей в восьми регионах России. Распространенность вируса колебалась от 0,6% до 7,8%, что соответствует или даже выше, чем распространенность вируса клещевого энцефалита. Мы продемонстрировали успешное воспроизведение вирусов Алонгшан и Янгоу в клеточных линиях клещей IRE/CTVM19 и HAE/CTVM8 без цитопатического эффекта.

Согласно филогенетическому анализу штаммы вируса Алонгшан были разделены на две группы: группу *Ixodes persulcatus* и группу *Ixodes ricinus*. Кроме того, группа *I. persulcatus* разделилась на европейскую и азиатскую подгруппы. Мы обнаружили аминокислотные замены, характерные для групп *I. ricinus* и *I. persulcatus*, а также для европейской и азиатской подгрупп группы *I. persulcatus*.

Оценки эволюционного расхождения между всеми полными последовательностями белков VP1a и VP1b вируса

Янггоу (из Китая и России) показали большее расхождение в нуклеотидных последовательностях VP1b, чем у VP1a, а средние расхождения составили 3,05% и 1,85% соответственно. Однако большее расхождение в аминокислотных последовательностях наблюдалось в VP1a, чем в VP1b, а средние расхождения составили 1,05% и 0,60% соответственно.

Таким образом, мы впервые показали широкую циркуляцию вирусов Янггоу и Алонгшан на территории России.

Работа поддержана грантом РФФИ №21-14-00245.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ МОНИТОРИНГЕ ЗА ГРИППОМ ПТИЦ НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РОССИИ

Лебедева Л.А., Савосина Л.В., Жалейко З.П., Резник В.И.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае», Хабаровск, Россия

Актуальность. Вирусы гриппа А широко циркулируют в природе, инфицируют многие виды млекопитающих и птиц, чаще всего водного и околоводного комплекса. Все вирусы циркулирующие, как в человеческой популяции, так среди животных и птиц способны к обмену генетическим материалом в процессе реассортации [1]. За последние годы отмечены, хотя и редкие, случаи преодоления межвидового барьера и инфицирования людей вирусами птичьего гриппа А субтипов H5N1; H9N2; H7N7; H7N3 в странах Юго-Восточной Азии и некоторых странах Европы и США.

Цель. В 2016 году приказом Роспотребнадзора №842 была создана система опорных баз по мониторингу за вирусом гриппа с пандемическим потенциалом на границе «человек — животные». Одна из этих баз создана при Управлении Роспотребнадзора по Хабаровскому краю с включением учреждений Роспотребнадзора территорий входящих в Дальневосточный Федеральный округ. Приводим анализ исследований за 2022 год.

Материалы и методы. Согласно плану по мониторингу за возможным заносом вирусов гриппа с перелетными птицами Хабаровская ОБ организует ежегодно в весенний и осенний период обследование перелетных птиц на носительство вирусов гриппа А.

В период возникновения вспышки птичьего гриппа на птицефабрике исследовался материал от падших птиц, смывы с предметов окружающей среды, смет (помет птичий), а также носоглоточные мазки сотрудников птицефабрики. Исследования проводили лаборатория Хабаровской противочумной станции, вирусологическая лаборатория ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае», ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Для постановки ПЦР использовали наборы реагентов «АмплиСенс Influenza A/B-FL»; АмплиСенс Influenza A/H/-swine-FL»; АмплиСенс Influenza virus A-FL (H1N1, (H3N2)); АмплиСенс Influenza virus A-FL (H5N1)); АмплиСенс Influenza virus A-FL (H5, H7, H9)).

Результаты. В апреле 2022г. в Комсомольском районе Хабаровского края зафиксирован массовый падеж ворон, в связи с чем, в ГНЦ ВБ «Вектор» направлено 15 проб биоматериала от трех птиц, собранных в п. Хальгасо, Комсомольского района. Во всех пробах выявлен вирус гриппа птиц А/Н5N1/. Для ретроспективного выявления факта инфицирования человека вирусом гриппа птиц у жителей поселков, приграничных к месту выявления падших ворон отобрано и отправлено в ГНЦ ВБ «Вектор» 72 сыворотки крови. По результатам — антител к гриппу птиц не выявлено.

В соответствии с планом работы опорной базы, Хабаровской ПЧС в апреле — мае 2022 года проведено тестирование на грипп А биологического материала от 35 диких водоплавающих птиц, добытых в поймах рек Хабаровского и Амурского районов. РНК вируса гриппа птиц не выявлена.

В октябре проведено тестирование на грипп А биологического материала от 38 диких водоплавающих птиц, добытых в пойме протоки Амурской на территории Хабаровского края и на пограничном с КНР острове Большой Уссурийский, РНК вируса гриппа птиц выявлена у двух чирков — Н9 и Н5 у серой утки. Положительный материал отправлен в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», где результаты были подтверждены.

В октябре 2022 года на птицефабрике г. Комсомольска-на-Амуре возникла вспышка птичьего гриппа вызвавшая падеж птиц. В соответствии с программой наблюдения за циркуляцией птичьих вирусов гриппа Хабаровская ОБ совместно с ГНЦ ВБ «Вектор» в октябре — ноябре 2022 года организовала и провела исследования по расшифровке этиологии вспышки птичьего гриппа возникшей на территории края. Были отобраны биопробы от 12 падших кур (36 проб), птичий помет (смет), смывы с поверхностей цеха №17 (10 проб) и 25 смывов из санпропускника и других помещений птицефабрики после проведения дезинфекционных работ, а также носоглоточные мазки сотрудников — таблица 1.

ТАБЛИЦА 1. ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РАСШИФРОВКА ВСПЫШКИ ГРИППА НА ПТИЦЕФАБРИКЕ В Г. КОМСОМОЛЬСКЕ-НА-АМУРЕ В ОКТЯБРЕ 2022Г.

Вид материала	Количество направленных проб в ГНЦ ВБ «Вектор»	Результат исследований
Биопробы от 12-ти падших кур	36	Во всех пробах РНК вируса гриппа А/Н5N1/
Смывы с поверхностей в цеху №17	10	Во всех пробах РНК вируса гриппа А/Н5N1/
Птичий смет	2	Во всех пробах РНК вируса гриппа А/Н5N1/
Носоглоточные мазки от здоровых сотрудников	241	у 2-ух сотрудников выявлена РНК вируса гриппа Н5
Носоглоточные мазки от сотрудников с ОРВИ и контактных с ними лиц	3	РНК вируса гриппа не выявлена
Повторно собранные носоглоточные мазки от сотрудников, положительных на грипп Н5 и контактных с ними лиц	16	РНК вируса гриппа не выявлена
Парные сыворотки крови от сотрудников птицефабрики	318	антител к вирусам гриппа птиц не выявлено

Во всех биопробах падших кур выявлены РНК вируса гриппа А/Н5N1/. В смывах с поверхности цеха №17 — 10 проб, выявлена РНК вируса А/Н5N1/, также в 2-ух пробах смета. Смывы с поверхностей после проведения дезинфекции — были отрицательные (25 штук).

Среди 241 сотрудника птицефабрики без признаков ОРВИ в 2-ух случаях выявлены РНК вируса А/Н5N1/. У больных в этот период ОРВИ и контактных лиц положительных находок не было.

Вирусологической лабораторией ФБУЗ «ЦГиЭ в Хабаровском крае» весной и осенью обследовано 100

больных гриппом и ОРВИ, проживающих в местах массового скопления перелетной и домашней птицы на наличие РНК вирусов гриппа, с отрицательным результатом.

Вывод. Таким образом, по результатам исследований, заболевание кур на птицефабрике г. Комсомольска-на-Амуре вызвано вирусом гриппа птиц А/Н5N1/. Выявление РНК вируса у двух сотрудников — следствие механического заноса, которое не привело к преодолению межвидового барьера — заражению и развитию инфекционного процесса.

НОВЫЕ ЗООНОЗНЫЕ ВИРУСЫ, ИЗОЛИРОВАННЫЕ ОТ ГРЫЗУНОВ И НАСЕКОМОЯДНЫХ, ОБНАРУЖЕННЫЕ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Булычева Ю. И.¹, Бутенко А. М.¹, Маркина Т. А.², Альховский С. В.¹

¹ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

² Окский государственный природный биосферный заповедник, Рязанская область, Россия

Грызуны (Rodentia), как и насекомоядные (*Eulipotyphla*) являются важнейшим природным резервуаром для вирусов человека и животных. Рыжие полёвки (*Myodes glareolus*) являются основным резервуаром для вируса Пуумала (*Hantaviridae*) — возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Также они являются резервуаром нового вируса рыжих полёвок (ВРП, *Paramyxoviridae*), изолированного в Уфе в 1973 году. Обыкновенная бурозубка (*Sorex araneus*) является резервуаром для нового хантавируса Алтай, изолированно-

го в 2019 году в Новосибирске. Последние исследования показывают, что мелкие грызуны и насекомоядные являются носителями множества РНК-содержащих вирусов, включая вирусы со схожей с хантавирусами экологией. Значение этих вирусов в патологии человека остается неизученным.

Целью настоящей работы было определение распространённости парамиксовирусов и хантавирусов среди бурозубок и рыжих полёвок, а так же детекция новых вирусов с помощью метода полногеномного секвенирования.

Были разработаны гнездовые ПЦР тест-системы для обнаружения РНК новых хантавирусов и парамиксовирусов. С их помощью были обследованы 255 проб органов грызунов и насекомых (62 пробы от обыкновенной бурозубки, 148 проб от рыжей полёвки, 16 проб от желтогорлой мыши, 9 пробы от малой лесной мыши, 7 пробы от полевой мыши, 8 проб от домовый мыши и 5 проб от тёмной полёвки), отловленных в Рязанской области. Было сформировано 6 пулов для создания ДНК-библиотек для полногеномного секвенирования на платформе MiSeq (*Illumina*). Обработка данных секвенирования проводилась в программе CLC Genomics Workbench (Qiagen), филогенетический анализ проводился в программе MEGA X.

РНК ВРП была обнаружена в одной из проб от рыжей полёвки, что составило 0,67% от общего количества обследованных проб. РНК хантавирусов была обнаружена в 7 пробах от рыжих полёвок, 3 пробах от желтогорлых мышей и 6 пробах от бурозубок разных видов, что составило 6,2% от общего количества обследованных проб. Обследование проб для обнаружения РНК хепевирусов (Heperviridae) и борнавирусов (Bornaviridae) не дало положительных результатов.

В результате полногеномного секвенирования удалось обнаружить фрагменты нескольких геномов — два генома вирусов семейства *Paramyxoviridae* и два генома семейства *Hantaviridae*. Первый парамиксовирус наиболее схож с вирусом Погорье, род *Jeilongvirus*, 95% схожести при сравнении аминокислотной последовательности РНК-полимеразы. Второй парамиксовирус наиболее схож с вирусами рода *Henipavirus*, изолированными от бурозубки в Китае, 77% схожести при сравнении аминокислотной последовательности матричного белка. Первый хантавирус наиболее схож с вирусом Алтай, род *Orthohantavirus*, 98% схожести при сравнении аминокислотных последовательностей РНК-полимеразы, нуклеокапсида и гликопротеина. Второй хантавирус наиболее схож с вирусом Сивис, род *Orthohantavirus*, выделенным в Швейцарии, 99% схожести при сравнении аминокислотных последовательностей нуклеокапсида и гликопротеина.

По итогам проведённого исследования установлена циркуляция вируса рыжих полёвок (*Paramyxoviridae*) и хантавирусов (*Hantaviridae*) на территории Рязанской области. Обнаружены фрагменты геномов новых вирусов семейств *Paramyxoviridae* и *Hantaviridae*.

CLINICAL AND ANALYTICAL EFFICIENCIES EVALUATION OF “MV AMP PS” RT– QPCR ASSAY FOR MEASLES VIRUS DETECTION

Chayeb V.A., Shirobokova S.A., Shabalina A.V., Dolgova A.S., Dedkov V.G.

Saint Petersburg Pasteur Institute, 14 Ulitsa Mira, 197101 Saint Petersburg, Russia.

Introduction: Measles is an infectious disease caused by the *Measles virus (MeV)*, an airborne pathogen with a negative-sense RNA genome. Spreading modalities of Measles are occurring through inhalation of respiratory droplets.

Measles clinical presentation is characterized by a prodromal phase with fever, conjunctivitis, rhinorrhea and cough, followed by a morbilliform rash.

The severity of MeV infection has been greatly reduced by the development of a live attenuated vaccine, which has been incorporated into vaccination programs in many countries. A fact, that has led to an undoubted reduction in measles incidence and the hope of eliminating the circulation of the virus.

The popularity of the anti-vaccination movement, as well as the active crossing of the Russian border by migrants from countries with poor access to health facilities, has led to several outbreaks of measles in the country in recent years.

During outbreak scenarios, a rapid and transportable method could eliminate issues of cohorting suspected and known MeV patients for lack of diagnostic certainty.

Aims and objectives: This study aims to evaluate diagnostic performances of a newly designed RT-q PCR Measles detection kit (MV Amp PS) for Measles confirmation for outbreak detection purposes and national surveillance in the framework of the Sanitary Shield project.

Materials and methods: From February to June 2023, we had conducted a retrospective diagnostic evaluation study on one-hundred nasopharyngeal swabs and urine samples, stratified into MV-positive and MV-negative. The final subset contained matched urine and swab pairs for 25 MV-positive and 25 MV-negative samples and was used for clinical effectiveness evaluation.

In order to assess analytical effectiveness indicators, two sets of samples were tested; a standard sample of MV RNA containing a suspension of MS2 pseudovirus particles containing target nucleotide sequence, and 12 samples of heterologous viruses.

RNA isolation was performed by “Riboprep” and “Mag-nosorb” isolation kits (Amplisens, Russia).

RT-q PCR was assessed by the MV Amp PS detection kit, qPCR measurements were performed using the C1000 Touch (Biorad, USA) and Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany) real-time PCR systems. All the analyses were automatically established using the default settings.

Statistical analysis was performed by the SPSS.22 software.

Main results: MV Amp PS clinical efficiency evaluation had demonstrated that there were no significant differences between Ct values measurements obtained during the detection of RNA dependent RNA polymerase target sequence fluorescence signal on HEX channel when stratifying accord-

ing to biological sample (urine,swab) on CFX 96 (Biorad) ($p=0,25$) and Rotor-Gene Q ($p=0,28$) RT-qPCR systems when performing Levene's test.

Our work had confirmed main indicators of analytical effectiveness: the MV Amp PS kit had demonstrated a limit of detection (LoD) of 500 copies/ml.

The analytical specificity to MeV and the absence of cross-reactivity with 12 samples of heterologous viruses, as respiratory syncytial, human virus, human parainfluenza virus type 1, human parainfluenza virus type 4b, human rhinovirus type 17, SARS-CoV-2 coronavirus, human

adenovirus type 6, human Coxsackie virus type B1, human echovirus type 4, human parechovirus type 1, human herpes virus type 5, mumps virus and rubella virus were confirmed.

Both diagnostic sensitivity and the diagnostic specificity were 100 %. True diagnostic sensitivity and diagnostic specificity were equal to 90% and 95% respectively.

Conclusions. Our work had evaluated main performances of the newly manufactured MV Amp PS detection kit. Many other parameters are needing to be considered and more samples should be processed.

Раздел 16. ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ И ПРОБЛЕМЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

РАЗРАБОТКА ТЕСТОВ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *CANDIDA ALBICANS*, *CANDIDA GLABRATA*, *CANDIDA KRUSEI* И *CANDIDA AURIS*

Глуценко Е.Е., Данилов Д.И., Савочкина Ю.А., Данилова В.С., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Инфекции, вызванные грибами, преимущественно представителями *Candida* spp, представляют значимую часть этиологического спектра нозокомиальных инфекций, особенно у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Инвазивный кандидоз у пациентов ОРИТ по данным различных исследований выявляется с частотой от 1 до 10 %, и характеризуется высокой летальностью. Наиболее высокая частота кандидемии наблюдается у пациентов отделений абдоминальной хирургии и больных со злокачественными опухолями. Диагностика инвазивных кандидозов с помощью традиционных методов микологического посева является слишком длительной и недостаточно эффективной. Применение быстрых молекулярных методов в дополнение к культуральному исследованию должно позволить значительно ускорить и одновременно повысить эффективность выявления основных возбудителей при диагностике инвазивного кандидоза с целью своевременного назначения антимикотиков.

В конце 2022г. ВОЗ опубликовала первый список приоритетных грибковых патогенов, включающий 19 групп возбудителей грибковых инфекций, которые характеризуются высокой летальностью, распространенностью, устойчивостью к антимикотикам, куда вошли пять основных наиболее распространенных видов возбудителей кандидоза — *C.albicans*, *C.glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*), *C.krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*, и получивший распространение в последние годы в различных странах мира патоген *Candida auris*, характеризующийся полирезистентностью к различным группам антимикотиков.

В настоящее время существуют и успешно применяются в практике тесты на основе ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) нескольких российских производителей для выявления и видовой дифференцировки вышеназванных видов возбудителей в различном биологическом материале. Актуальной задачей является разработка новых тестов для выявления ДНК приоритетно значимых видов возбудителей кандидоза на основе новых изотермических методов амплификации, которые позволили бы значительно сократить время проведения анализа, а также упростить его процедуру.

Целью данной работы было разработать тесты для выявления и видовой дифференцировки ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, и *C.auris* на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP) и провести их первичную апробацию.

Материалы и методы. Для разработки нового молекулярного теста был выбран метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) с детекцией продуктов амплификации с помощью флуоресцентно-меченого праймера. Дизайн праймеров для генов-мишеней был произведен с использованием ПО PrimerExplorer V5 (Eiken Chemical Co., Ltd.). В качестве ДНК-мишеней для каждого из возбудителей были выбраны регион ITS2 спейсера с примыкающим участком гена 5.8S рРНК.

Для проведения LAMP-реакции была выбрана температура 64°C в течение 50 циклов по 30 секунд. Реакцию LAMP с детекцией в режиме реального времени проводили на амплификаторах CFX96 (BioRad, США) или ДТ-прайм (ДНК-технология, Россия).

Для апробации разработанного теста проводилось тестирование панели штаммов и ранее охарактеризованных клинических изолятов различных видов *Candida*, отрицательных (N=20) и модельных положительных образцов крови (N=35) и гемокультур (N=35). Содержание ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei* в модельных образцах определяли с помощью набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК грибов рода *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* методом мультиплексной ПЦР «АмплиСенс® Флороценоз / Кандиды-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия).

Выделение ДНК из образцов биоматериала после предварительной обработки проводили для образцов крови — с использованием комплекта реагентов «АмплиТест® Рибо-преп», для образцов гемокультур — комплекта реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ДНК-Аллегро» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России). Для контроля этапов экстракции ДНК и амплификации использовался экзогенный внутренний контроль (ВКО), представляющий собой искусственно синтезированную последовательность ДНК, клонированную в ДНК фага лямбда.

Результаты. Разработаны два диагностических теста на основе метода изотермической амплификации (LAMP), первый из которых позволяет выявлять ДНК *C. albicans*, *C. glabrata* *N.glabrata*) и *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), а второй предназначен для выявления ДНК *C.auris*. Первый тест включает проведение двух реакций, в каждой из которых регистрируются две ДНК-мишени. В первой реакции происходит одновременная амплификация и детекция фрагмента ДНК *N.glabrata* и ДНК экзогенного внутреннего контроля

(ВКО). Во второй реакции происходит амплификация и детекция ДНК *S.albicans* и *S.krusei*. Второй тест выполняется путем проведения одной реакции для одновременной амплификации и детекции *S.auris* и ДНК ВКО. Для детекции используются мишень-специфичные флуоресцентно-меченые праймеры. Предел обнаружения составил (1-3)х10³ копий/мл для каждой из определяемых ДНК-мишеней. Общее время проведения амплификации — около 35 минут.

Получены соответствующие результаты тестирования ДНК штаммов, клинических изолятов *S. albicans*, *N.glabrata*, *P.kudriavzevii* и *S.auris* и содержащих один из этих видов или не содержащих их и других *Candida* spp гемокультур с использованием разработанных LAMP-тестов. Во всех модельных положительных образцах крови (с содержанием

ДНК-мишеней в диапазоне от 1000 до 10 000 копий/мл) с помощью новых тестов на основе LAMP были выявлены ДНК соответствующего вида возбудителя (одного из 4 анализируемых видов), для всех отрицательных образцов получены отрицательные результаты.

Заключение. Два разработанных теста на основе изотермической амплификации методом LAMP позволяют выявлять и дифференцировать ДНК 4 видов возбудителей кандидоза — *S. albicans*, *S. glabrata* (*N.glabrata*), *S. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) и *S.auris* в образцах крови и гемокультур. В перспективе применение таких тестов в диагностике позволит в самые краткие сроки предоставлять информацию необходимую для своевременного назначения антимикотиков.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ST308 С КАРБАПЕНЕМАЗОЙ NDM-1

Шаповалова В.В.¹, Чулкова П.С.², Агеев В.А.², Авдеева А.А.², Нурмуханова В.А.¹, Мацвай А.Д.¹, Плешков В.Ю.³, Попенко Л.Н.³, Савочкина Ю.А.¹, Шипулин Г.А.¹, Сидоренко С.В.²

¹ ФГБУ «ЦСП» ФМБА, Москва, Россия

² ФГБУ «ДНКЦИБ» ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

³ ФБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Введение. *Pseudomonas aeruginosa* — важный внутрибольничный патоген, который может вызывать ряд инфекций, включая инфекции мочевыводящих путей, нижних дыхательных путей, кожи и мягких тканей, генерализованные инфекции, приводящие к сепсису. В последние годы внутрибольничные инфекции, вызванные *P. aeruginosa*, стали еще более значимой проблемой в клинической практике из-за широкого распространением штаммов с приобретенными механизмами устойчивости к основным группам антимикробных препаратов. У *P. aeruginosa* устойчивость к карбапенемам может быть обусловлена сочетанием наличия β-лактамаз, мутациями в генах поринов, гиперэкспрессией системы эффлюкса MexAB-OprM и/или изменениями пенициллин-связывающего белка. Важнейшими β-лактамазами синегнойной палочки являются карбапенемазы группы металло-β-лактамаз (МБЛ), которые гидролизуют все β-лактамы, исключая монобактамы. К наиболее распространенным среди *P. aeruginosa* карбапенемазам относятся ферменты VIM- и IMP-типов. Однако в последние годы в ряде стран были выявлены *P. aeruginosa*, с генами blaNDM-типа.

Цель исследования. Провести молекулярно-генетическую характеристику штаммов *P. aeruginosa*, несущих ген blaNDM-1, выявленных в многопрофильном стационаре Санкт-Петербурга.

Материалы и методы. В работу включены 9 изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от больных с разными формами внутрибольничных инфекций. Изоляты были получены в декабре 2022 года из стационара города Санкт-Петербурга. Идентификацию культур, выращенных

на агаре Мюллера-Хинтона, проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex LT («Bruker Daltonics», Германия). Оценку МПК антибиотиков проводили методом серийных микроразведений согласно рекомендациям EUCAST. Для детекции генов карбапенемаз использовали ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Выделение тотальной бактериальной ДНК проводили с помощью мини-набора Allprep DNA/RNA (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкциями производителя и использовали во всех последующих процедурах. Секвенирование проводили на системе Illumina NextSeq 550 с использованием набора NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 циклов) (Illumina, США). Сборку геномов осуществляли с помощью программы Spades v.3.15.3 после предварительной оценки качества и очистки ридов программами FastQC и Trimmomatic. Секвенирование проводилось с помощью программы MLST. Аннотацию геномов проводили с помощью программы AMRFinder v.3.11.18. Определение значений средней идентичности нуклеотидов (ANI) осуществляли с помощью программы «FastANI» v.1.34. Филогенетический анализ проведен с помощью программ Snippy v.4.6.0, Gubbins v.3.3.1 и FastTree v.2.1.10.

Результаты. Всего было проанализировано 9 изолятов *P. aeruginosa*, несущих ген bla_{NDM-1}. Изоляты проявляли идентичный фенотип, были устойчивы к карбапенемам, цефалоспорином, в том числе ингибитор-защищенным, аминогликозидам, фторхинолонам, хлорамфениколу и ко-тримоксазолу, но оставались чувствительны к колистину. Все изоляты принадлежали к международному клону ST308 и дополнительно к гену bla_{NDM-1} обладали генами β-лактамаз

*bla*_{OXA-48B}, *bla*_{PDC-19a}, *bla*_{PAC-1} и *bla*_{OXA-10r} генами устойчивости к аминогликозидам (*rmtF2*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-II*, *aadA11*, *aph(6)-Id*, *aph(3)-Ib*, *aph(3)-IIb*), сульфаниламидам (*sul1*, *sul2*), триметоприму (*dhfrB5*), хлорамфениколу (*floR*, *catB7*), макролидам (*msrE*), блеомицину (*ble*), фосфомицину (*fosA*) и хинолонам (*crpP* (8/9), *qnrVC1*). Для проведения филогенетического анализа из базы данных NCBI GenBank (01.09.2023) выгружено дополнительно 317 геномов NDM-1-положительных *P.*

aeruginosa ST308 из пяти стран: Сингапур (n = 302), США (n = 12), Греция (n = 2) и Ливан (n = 1). Полученная выборка обладала высокими значениями межгеномного нуклеотидного сходства ANI (average nucleotide identity) с минимальным значением 99.74. Филогенетическое дерево NDM-1-положительных геномов *P. aeruginosa* ST308 приведено на Рисунке. Исследуемые образцы из России образовали отдельную ветку с образцами из США, Ливана и Греции.



Рисунок. Филогенетическое дерево NDM-1-положительных геномов *P. aeruginosa* ST308.

Заключение. По нашим сведениям, это первое обнаружение *P. aeruginosa* с карбапенемазой NDM-типа в России. Изоляты обладали схожим фенотипом и генотипом резистентности, проявляя устойчивость к различным антибиотикам. На сегодняшний день глобальная популяция NDM-положительных *P. aeruginosa* ST308 характеризуется высокой степенью нуклеотидного сходства, она представлена в основном изолятами из Сингапура, где их первое выделение было зафиксировано в 2013 г. (Prakki,

Vasoo, 2023). В пределах этой генетической линии отмечено формирование сублинии, к которой относятся российские NDM-положительные изоляты, анализируемые в данном исследовании, а также изоляты из США, Греции и Ливана. Глобальное распространение указанной сублинии может составить серьезную угрозу системе здравоохранения и позволяет предположить наличие у ее представителей новых свойств, требующих дальнейшего изучения.

РАЗРАБОТКА ТЕСТА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕНОВ МЕТАЛЛО-В-ЛАКТАМАЗ ГРУППЫ VIM И СЕРИНОВЫХ КАРБАПЕНЕМАЗ ГРУППЫ GES-5 У *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Глушченко Е.Е., Савочкина Ю.А., Данилов Д.И., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. *Pseudomonas aeruginosa* является одним из наиболее распространенных возбудителей нозокомиальных инфекций во всем мире. Одновременно с этим этот микроорганизм относится к наиболее проблемным возбудителям инфекций в силу природной устойчивости к большинству бета-лактамовых антибиотиков и нарастающей приобретенной устойчивости к карбапенемам, а также к другим основным группам антимикробных препаратов, распространения экстремально-резистентных штаммов. Инфекции, вызванные карбапенем-резистентными штаммами *P. aeruginosa* представляют собой важную клиническую проблему, поскольку являются причиной неэффективности эмпирической терапии, приводят к высоким показателям летальности, увеличению сроков и стоимости лечения.

Важным механизмом, определяющим устойчивость значительной доли изолятов *P. aeruginosa* к карбапенемам и другим бета-лактамовым антибиотикам является продукция приобретенных карбапенемаз — преимущественно металло-β-лактамаз (МБЛ) группы VIM и сериновых карбапенемаз группы GES-5-подобных. В последние годы по данным различных исследований наблюдается рост распространенности карбапенемаз группы GES-5 у изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в российских стационарах. В то же время отсутствуют молекулярно-диагностические тесты российского производства, направленные на детекцию генов карбапенемаз группы GES-5. Таким образом, существует необходимость в разработке быстрых и эффективных молекулярных тестов для одновременного определения у *P. aeruginosa* ге-

нов карбапенемаз группы GES-5 и генов МБЛ распространенной группы VIM, что и являлось целью нашей работы.

Материалы и методы. Для разработки теста был выбран метод ПЦР с детекцией

в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов. Для детекции однонуклеотидной замены, отличающей гены карбапенемаз группы GES-5-подобных от других генов бета-лактамаз группы GES, были выбраны аллель-специфичные флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды с LNA-модифицированными основаниями. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей целевых генов-мишеней, полученных из базы данных NCBI, проводили в программе MEGA (v.1.1). Наличие неспецифических вторичных структур проверяли с помощью программы PrimerSelect пакета DNASTar, специфичность олигонуклеотидов оценивали с помощью онлайн-сервиса BLASTn.

Разработанный ПЦР-тест на первом этапе был апробирован путем тестирования панели образцов ДНК 62 клинических изолятов *P.aeruginosa*, ранее охарактеризованных методом полногеномного секвенирования (WGS).

Секвенирование ДНК изолятов *P.aeruginosa* проводили на системе Illumina NextSeq 550 с использованием набора NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 циклов) (Illumina, США). Сборку геномов осуществляли с помощью программы Spades v.3.15.3.

Экстракция ДНК из образцов бактериальных культур для проведения ПЦР проводилась с использованием комплекта реагентов для экстракции экспресс-методом «БК-3-step», из образцов биологического материала — с помощью набора «АмплиТест® Рибо-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва). Для контроля этапов экстракции ДНК и ПЦР использован внутренний контрольный образец (ВКО), представляющий собой искусственно синтезированную последовательность ДНК, клонированную в ДНК фага лямбда. Концентрации ДНК-мишеней в препаратах ВКО и положительного контрольного образца (ПКО) измеряли методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (BioRad, США).

Аналитическую чувствительность оценивали на мо-

дельных образцах биологического материала с добавлением разведений положительного контрольного образца. Для оценки аналитической специфичности была протестирована панель ДНК штаммов бактерий, включая *P.aeruginosa*, в том числе, *P.aeruginosa*, обладающей геном *blaGES-1*, и 12 других распространенных видов возбудителей нозокомиальных инфекций, без анализируемых генов-мишеней.

Результаты. Разработан тест, включающий проведение одной мультиплексной ПЦР-РВ, позволяющий одновременно детектировать и дифференцировать гены МБЛ группы VIM и гены сериновых карбапенемаз группы GES-5. Тест включает использование экзогенного внутреннего контроля.

Предел обнаружения для обеих групп детектируемых генов-мишеней составил 10³ копий/мл. Аналитическая специфичность теста подтверждена при анализе панели ДНК штаммов бактерий, не обладающих целевыми генами, включая ДНК *P.aeruginosa*, обладающей геном *blaGES-1*, и ДНК штаммов 12 других распространенных видов возбудителей нозокомиальных инфекций. На первом этапе апробации разработанного ПЦР-теста были получены правильные результаты выявления генов карбапенемаз групп VIM и GES-5 для всех протестированных карбапенем-резистентных изолятов *P.aeruginosa*, несущих гены МБЛ группы VIM (n=14) или гены карбапенемаз группы GES-5 (n=3), и изолятов *P.aeruginosa*, не обладающих целевыми генами (n=45), в соответствии с данными полногеномного секвенирования. Далее с помощью нового ПЦР-теста были получены соответствующие результаты анализа 30 нативных отрицательных образцов биоматериала (мочи, аспирата из трахеи) и 30 модельных образцов биоматериала с добавлением ПКО в концентрациях от 10³ до 10⁴ копий/мл.

Заключение. Разработанный тест на основе ПЦР в режиме реального времени позволяет эффективно определять и дифференцировать гены металло-β-лактамаз группы VIM и гены сериновых карбапенемаз группы GES-5 у *P.aeruginosa* в образцах биоматериала и бактериальных культур. В перспективе внедрение такого теста в практику позволит в краткие сроки выявлять *P.aeruginosa*, обладающие генами карбапенемаз указанных основных групп, при диагностике нозокомиальных инфекций.

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИМИКОТИКАМ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ШТАММОВ *CANDIDA PARAPSILOSIS*

Сидоренко В.А., Юсупова Е.П., Мартынова А.В.

ФГАОУ Дальневосточный Федеральный Университет, Владивосток, Россия

Актуальность. Комплекс *Candida parapsilosis* возник как условно-патогенный грибковый патоген, вызывающий внутрибольничные инфекции во всем мире. Он состоит из трех генетически различных видов, а именно *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. ortopsilosis* и *C. metapsilosis*, которые физиологически и морфологически неотличимы. Тем не менее, существующие различия в динамике выработки факторов патогенности и устойчивости к антибактериальным хими-

опрепаратам может существенно менять эпидемическое значение данного возбудителя в том числе и в роли внутрибольничного возбудителя.

Целью данного исследования было определение формирования биопленок, внеклеточной ферментативной активности 22 клинических изолятов комплекса *Candida parapsilosis*, выделенных в условиях ОРИТ.

Методы. Молекулярную идентификацию видового ком-

плекса *C. parapsilosis* проводили с использованием ПЦР RFLP (BanI) гена SADH и пироквенирования области ITS 1 и области ITS2. Была оценена чувствительность наших изолятов к противогрибковым препаратам и активность молекулярных механизмов, лежащие в основе устойчивости к азолам (молекулярными маркерами были выбраны ERG11, CDR1, MDR1, и MRR1). Устойчивость к антимикотикам была определена согласно методике CLSI для флюконазола (чувствительный (S) ≤ 2 мкг/мл, чувствительный дозозависимый (SDD) 4 мкг/мл, устойчивый (R) ≥ 8 мкг/мл), для интраконазола ($S \leq 0,125$ мкг/мл, SDD 0,25–0,5 мкг/мл, R ≥ 1 мкг/мл), для вариконазола ($S \leq 0,125$ мкг/мл, S-DD 0,25–0,5 мкг/мл, R ≥ 1 мкг/мл).

Для изучения генетических детерминант, определяющих формирование механизмов устойчивости к азолам, применялся анализ RT-qPCR в процессе которого измерялись уровни мРНК и ДНК тестируемых генов (ERG11, CDR1, MDR1 и MRR1). Праймеры и зонды были созданы с использованием программного обеспечения Primer3 (<https://primer3.org/>).

Результаты. 54,5% *C. parapsilosis* были фосфолипидо-положительными с умеренной активностью для большинства штаммов. Ни один из изолятов *C. metapsilosis* или *C. ortopsilosis* не был способен продуцировать фос-

фолипазу. Высокая активность казеиназы выявлена у *C. parapsilosis*. 86,36% штаммов *C. parapsilosis* и все изоляты *C. metapsilosis* и *C. ortopsilosis* продуцировали желатиназу. Все штаммы обладали способностью проявлять гемолиз на кровяном агаре. *C. metapsilosis* продемонстрировал низкую продукцию гемолизина со статистически значимыми различиями по сравнению с *C. parapsilosis* и *C. ortopsilosis*. Способность *C. parapsilosis* образовывать биопленки сильно зависела от штамма и имела значительную гетерогенность, которая была менее очевидна как для *C. ortopsilosis*, так и для *C. metapsilosis*. Некоторые изоляты *C. parapsilosis* соответствовали критерию дозозависимой чувствительности к флуконазолу (10,91%), итраконазолу (16,36%) и вориконазолу (7,27%). Более того, 5,45% и 1,82% изолятов *C. parapsilosis* были устойчивы к флуконазолу и вориконазолу соответственно. Все штаммы *C. metapsilosis* и *C. ortopsilosis* были чувствительны к азолам; и изоляты всех трех видов продемонстрировали 100% чувствительность к каспифунгину, амфотерицину В и 5-флуцитозину.

Выводы. Сочетание молекулярных механизмов, включая сверхэкспрессию ERG11 и генов, кодирующих откачивающие насосы (CDR1, MDR1 и MRR1), участвует в устойчивости к азолам у *C. parapsilosis*.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К КАРБАПЕНЕМАМ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ СОБАК И КОШЕК В Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

Гишян А.А.¹, Забровская А.В.²

¹ ООО «ДуоКор Лаб», Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины (СПбГУВМ), Санкт-Петербург, Россия

Введение. Распространение штаммов энтеробактерий, устойчивых к карбапенемам является актуальной проблемой для ветеринарии и медицины. Мелкие домашние животные, тесно контактирующие с людьми, могут стать для своих владельцев источником резистентных штаммов. Устойчивость к карбапенемам может быть обусловлена различными механизмами, однако самым распространённым является ферментная инактивация за счет продукции карбапенемаз. Карбапенемазы являются разновидностью бета-лактамаз и представлены в классах А (ферменты KPC, GES), D (OXA-48) — сериновые карбапенемазы и В (NDM, VIM, IMP) — металло-бета-лактамазы. Продукция карбапенемаз кодируется генами, зачастую расположенными на плазмидах, что способствует их быстрому распространению в условиях стационара.

Помимо резистентности к бета-лактамам антибиотикам штаммы, продуцирующие карбапенемазы, характеризуются множественной устойчивостью к другим классам антибактериальных препаратов, используемых в клинической практике — фторхинолонам, аминогликозидам и другим [1].

Появление таких штаммов приводит к низкой эффективности антибактериальной терапии, в том числе у пациентов с жизнеугрожающими инфекциями.

Цель исследования: определение типов карбапенемаз и анализ их распространенности у штаммов *Klebsiella*

pneumoniae, выделенных от собак и кошек с гнойно-септическими инфекциями в г. Санкт-Петербурге.

Материалы и методы. В исследование вошло 18 резистентных к карбапенемам штаммов *Klebsiella pneumoniae*.

Выделение микроорганизмов из клинического материала проводили классическим бактериологическим методом. Идентификацию проводили с использованием автоматического бактериологического анализатора BD PHOENIX M50. Определение чувствительности осуществляли диско-диффузионным методом на среде Мюллера-Хинтона с применением дисков Bioanalyse: амоксициллин-клавулановая кислота, цефтриаксон, цефтазидим, цефепим, эртапенем, имименем, меропенем, цiproфлоксацин, левофлоксацин, амикацин, гентамицин, триметоприм-сульфаметоксазол. Интерпретацию результатов проводили согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» версия 2021-01.

Выделение ДНК проводили из чистой культуры бактерии с использованием набора для экстракции НК Реал-Бест ДНК-экспресс (производство АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия).

Обнаружение детерминант резистентности к карбапенемам проводилось в выделенных образцах ДНК

методом ПЦР в режиме реального времени. Гены металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM выявляли с помощью диагностических наборов АмплиСенс MDR MBL-FL (производство ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия), гены сериновых β-лактамаз KPC и OXA-48-подобных выявляли с помощью диагностических

наборов АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL (производство ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) согласно инструкции производителя.

Результаты исследования:

Всего было исследовано 18 образцов клинического материала. Результаты исследования представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. ВЫЯВЛЕНИЕ ШТАММОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ КАРБАПЕНЕМАЗЫ, В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ, ПОЛУЧЕННОМ ОТ ЖИВОТНЫХ С ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Материал	Количество штаммов, продуцирующих карбапенемазы	Тип карбапенемазы
Моча	7	NDM (5), OXA-48 (2)
Раневое отделяемое	4	NDM
Желчь	2	NDM
Брюшной выпот	1	NDM
Бронхоальвеолярный лаваж	1	NDM
Аспират пазух носа	1	NDM
Мазок из ротовой полости	1	NDM

Больше всего штаммов *Klebsiella pneumoniae*, резистентных к карбапенемам, было выделено из мочи, ран и желчи. Всего в образцах было выделено два типа карбапенемаз: сериновые карбапенемазы OXA-48 и металло-β-лактамазы типа NDM. NDM карбапенемазы встречались в 16 из 18 образцов (89%), карбапенемазы OXA-48 были обнаружены только в двух образцах из 18 (11%).

Обсуждение и выводы: проведенное исследование показало, что преобладающей группой карбапенемаз в Санкт-Петербурге являются карбапенемазы NDM (89%), также обнаруживали карбапенемазы группы OXA-48 (11%). Другие типы карбапенемаз в рамках исследования выявлены не были. Результаты исследования не противоречат данным о выделяемых карбапенемазах в клиниче-

ских образцах от людей, согласно которым NDM карбапенемазы выявляются в 55% случаев и являются наиболее распространенными в г. Санкт-Петербург, OXA-48 в 30%, их сочетание — в 14% случаев, все остальные типы карбапенемаз встречаются крайне редко [1]. Это может свидетельствовать об эпидемиологической связи резистентных к карбапенемам штаммов выделенных из клинических образцов людей и мелких домашних животных.

Библиографический список.

1. Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г., Трушин И.В., Эйдельштейн М.В., Авраменко А.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap — система мониторинга антибиотикорезистентности в России. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2021. — Т.23, №2. — С. 198-204.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДЕПОЛИМЕРАЗЫ БАКТЕРИОФАГА V_B_KPNP_NER40

Оснач.В.А., Шабалина А.В., Долгова А.С.

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность исследования. *Klebsiella pneumoniae* — грамм-отрицательная бактерия, которая является возбудителем различных заболеваний и относится к особой группе патогенов ESKAPE. Данная группа отличается гипервирулентностью и множественной устойчивостью к антибиотикам. Одной из причин гипервирулентности *K. pneumoniae* является наличие полисахаридной капсулы, которая защищает бактерию от неблагоприятных внешних факторов, в том числе, от иммунной системы хозяина и противомикробных препаратов. Бактерии, лишённые капсулы, становятся восприимчивыми к действию различных противомикробных препаратов. Поэтому актуальной

задачей является поиск химических соединений, способных разрушать полисахаридную капсулу *K. pneumoniae*.

Как известно, бактериофаги являются естественными вирусами бактерий. Заражение бактерии-хозяина происходит за счет связывания фага со специфическими рецепторами на поверхности клетки, в том числе с капсульным экзополисахаридом. Данное взаимодействие обуславливается рецептор-связывающими белками (РСБ), которые в большинстве случаев обладают деполимеразной активностью. Деполимеразы — ферменты, способные разлагать экзополисахаридную капсулу путем расщепления гликозидных связей. Разнообразие деполимераз бакте-

риофагов представляет особый интерес, поскольку они обладают высокой специфичностью, эффективностью, и их можно использовать совместно с разными противомикробными препаратами.

Цель и задачи исследования. Получение рекомбинантной деполимеразы, направленной на капсульный тип KL2 штаммов *K. pneumoniae*. Были выделены следующие задачи: сборка генетической конструкции с геном деполимеразы, подбор условий синтеза белка, проверка ферментативной активности полученного рекомбинантного белка.

Методы исследования. Последовательность гена деполимеразы была амплифицирована методом ПЦР. Далее последовательность была клонирована в экспрессионный вектор рGD. Отсутствие мутаций в последовательности было проверено методом секвенирования по Сенгеру. Проведена трансформация компетентных клеток *E. coli* T7 express полученной плазмидой. Проведен синтез белка. Лизис был выполнен методом замораживания-оттаивания, с последующей обработкой лизоцимом. Белок был очищен методом Ni-аффинной хроматографии. Проверку ферментативной активности проводили с помощью спот-теста.

Результаты. Последовательность гена деполимеразы была амплифицирована из геномной ДНК бактериофага vB_KrpP_NER40, специально подобранными праймерами, содержащими сайты рестрикции NdeI и XhoI. Была создана конструкция на основе вектора, содержащего полигистидиновый тэг. Для экспрессии гена деполимеразы Ner40 был использован коммерческий штамм клеток *E. coli* T7 express, который подходит для экспрессии потенциально токсичных для *E. coli* белков, а также обладающий повышенной степенью экспрессии рекомбинантных белков. Индукция прово-

дилась при разных условиях: сначала была рассмотрена 3-х часовая индукция с добавлением 0.1, 0.25 и 0.5 мМ ИПТГ при 37°C, затем 18-часовая индукция при 20°C с добавлением 0.1 мМ ИПТГ. Лизис белка проводили 3-мя циклами замораживания-оттаивания, с последующим добавлением смеси лизоцима с ДНКазой и РНКазой. Очистку лизата производили набором His-Spin Protein Miniprep. Эффективность синтеза белка была проверена с помощью SDS-электрофореза по методу Лэмли в полиакриламидном геле. Была проверена ферментативная активность лизата и очищенного белка с помощью точечного теста (spot-test) на чашках Петри на 2-х штаммах *K. pneumoniae* с разными капсульными типами — специфичном (KL2) и не специфичном (KL20) для данной деполимеразы. После нанесения лизата и очищенной рекомбинантной деполимеразы на культуру бактерии-хозяина, с соответствующим капсульным типом (KL2), на чашке появились литические пятна, а при нанесении на культуру бактерий, с другим капсульным типом (KL20), ферментативной активности не наблюдалось.

Выводы. В результате проделанной работы, был получен рекомбинантный белок — деполимераза бактериофага vB_KrpP_NER40. Были подобраны оптимальные условия индукции: 18-часовая индукция с добавлением 0.1 мМ ИПТГ при 20°C. Полученный лизат и очищенный белок обладают ферментативной активностью и разрушают капсулу у штаммов с капсульным типом KL2. В дальнейшем полученную рекомбинантную деполимеразу Ner40 можно будет использовать для определения капсульного типа *K. pneumoniae*, а также она может послужить вспомогательным агентом в комбинированной терапии инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, совместно с противомикробными препаратами.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБОТАННОГО ТЕСТА НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ ГРУПП NDM, ОХА-48 И КРС ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ЕГО В ДИАГНОСТИКЕ НОЗОКОМИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ

Данилов Д.И.¹, Глушченко Е.Е.¹, Савочкина Ю.А.¹, Данилова В.С.¹, Стрелкова Д.А.², Рачина С.А.², Кулешов В.Г.³, Шипулин Г.А.¹

¹ ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

³ БУЗ «ГКБ им. С.С.Юдина ДЗМ», Москва, Россия

Введение. Нозокомиальная пневмония (НП), включая вентилятор-ассоциированную пневмонию, является наиболее частой тяжелой инфекцией в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). НП, вызванная возбудителями, обладающими резистентностью к карбапенемам, экстремальной резистентностью, характеризуется высокой летальностью, увеличением сроков лечения и пребывания в ОРИТ. Таким возбудителем НП наиболее часто является *Klebsiella pneumoniae* или другие энтеробактерии, обладающие генами карбапенемаз групп NDM, ОХА-48-подобных или (и) КРС. Быстрое выявление энтеро-

бактерий, обладающих генами карбапенемаз, а также дифференциация генов карбапенемаз класса металло-β-лактамаз (МБЛ) с помощью молекулярных тестов на основе амплификации ДНК имеет важное диагностическое значение, поскольку эта информация требуется для своевременного выбора эффективной антибиотикотерапии.

В последние годы помимо широко используемого в практике метода ПЦР для разработки диагностических тестов применяются и более новые и быстрые методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот, среди которых наиболее часто используется петлевая изотермическая

амплификация (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP). Преимуществами таких методов, являются быстрота получения результатов (время проведения реакции амплификации сокращается до 15-40 минут) и возможность использования более простого оборудования. Однако до настоящего времени в нашей стране еще не было разработано диагностических тестов на основе изотермической амплификации, направленных на выявление возбудителей нозокомиальных инфекций, обладающих генами карбапенемаз или другими приоритетно-значимыми генами антибиотикорезистентности. Создание таких отечественных диагностических тестов представляет актуальную задачу.

В связи с этим, в Центре постгеномных технологий ФГБУ «ЦСП» нами был разработан тест и набор реагентов «АмплиТест® CP NDM/OXA-48/KPC LAMP» для его выполнения, позволяющий выявлять гены карбапенемаз групп NDM, OXA-48-подобных и KPC у энтеробактерий в биологическом материале, основанный на петлевой изотермической амплификации (LAMP). Набор реагентов «АмплиТест® CP NDM/OXA-48/KPC LAMP» прошел клинические испытания, в ходе которых подтверждены высокие показатели диагностической чувствительности и специфичности (100% по отношению к методу сравнения), и зарегистрирован в качестве медицинского изделия для применения в клинической лабораторной диагностике в РФ (РУ № РЗН 2023/20836).

Цель исследования. Проведение оценки эффективности выявления генов карбапенемаз у микроорганизмов в биоматериале пациентов при диагностике нозокомиальной пневмонии с помощью разработанного диагностического теста на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP) в сравнении с применяемыми в диагностике тестами на основе ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Материалы и методы. Для анализа использовали 98 образцов биоматериала из нижних дыхательных путей, полученных от 79 пациентов ОРИТ с признаками нозокомиальной пневмонии с декабря 2021 по февраль 2022 года. Образцы включали аспират из трахеи (ТА, n=68) бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ, n=5) и мокроту (n=25).

Выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью набора «АмплиТест® Рибо-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва) согласно инструкции, с использованием внутреннего контрольного образца. Для образцов мокроты проводилась предварительная обработка с помощью реагента «Муколизин».

Детекцию генов карбапенемаз групп NDM, OXA-48 и KPC проводили с помощью нового набора реагентов «АмплиТест® CP NDM/OXA-48/KPC LAMP» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва), основанного на изотермической амплификации с детекцией в режиме реального времени, и методом ПЦР-РВ с помощью наборов реагентов «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» и «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Москва). Детекция ДНК-мишеней в ходе изотермической амплификации при помощи набора «АмплиТест® CP NDM/OXA-48/KPC LAMP» производится с помощью мишень-специфичных флуоресцентно-меченых праймеров.

Результаты. Анализ с помощью разработанного нами набора реагентов «АмплиТест® CP NDM/OXA-48/KPC LAMP» позволил выявить гены карбапенемаз одной или нескольких групп у энтеробактерий в 29 (30 %) из 98 образцов биоматериала из дыхательных путей пациентов с признаками нозокомиальной пневмонии. Гены металло-β-лактамаз группы NDM были выявлены в 21 образце, в большинстве случаев в сочетании с генами сериновых карбапенемаз группы OXA-48. Гены сериновых карбапенемаз группы KPC были выявлены в 2 образцах в сочетании с генами групп NDM и OXA-48. Гены сериновых карбапенемаз группы OXA-48 были выявлены в 28 образцах, как в сочетании с другими генами карбапенемаз, так и отдельно. Для 69 образцов были получены отрицательные результаты, т.е. не обнаружены гены карбапенемаз ни одной из анализируемых групп. Результаты представлены в таблице 1. Все полученные результаты выявления генов карбапенемаз анализируемых групп с помощью теста на основе LAMP полностью совпадали с результатами, полученными методом ПЦР-РВ с помощью диагностических наборов реагентов «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» и «АмплиСенс® MDR MBL-FL».

ТАБЛИЦА 1. ГЕНЫ КАРБАПЕНЕМАЗ, ВЫЯВЛЕННЫЕ У МИКРООРГАНИЗМОВ В ИССЛЕДОВАННЫХ ОБРАЗЦАХ ТА, МОКРОТЫ И БАЛ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТОВ НА ОСНОВЕ LAMP И ПЦР-РВ

Результат ПЦР-тестов — выявленные группы генов карбапенемаз		Результат LAMP-теста			Число образцов
		Выявленные группы генов карбапенемаз / число образцов			
		NDM	OXA-48-like	KPC	
Положительные	NDM и OXA-48-like	18	18	–	18
	NDM, KPC и OXA-48-like	2	2	2	2
	NDM	1	–	–	1
	OXA-48-like	–	8	–	8
	Итого положительных	21	28	2	29
Отрицательные		77	70	96	69

Дополнительно оценили критерий времени амплификации до получения положительного результата — ТТР (time to positivity), сравнивая время пересечения поро-

вой линии графиком флуоресцентного сигнала при проведении теста на основе LAMP и теста на основе ПЦР. Медиана ТТР для детекции генов карбапенемаз группы NDM для

LAMP составила 23 минуты, а для ПЦР — 53 минуты. Для генов карбапенемаз группы OXA-48 медиана ТТР для LAMP составила 11,5 минут, а для ПЦР — 55 минут.

Заключение. Разработанный нами набор реагентов «АмплиТест® CP NDM/OXA-48/KPC LAMP» на основе метода LAMP позволяет эффективно выявлять гены карбапенемаз целевых групп NDM, OXA-48 и KPC в биологическом мате-

риале из нижних дыхательных путей при диагностике нозокомиальной пневмонии.

Внедрение новых методик на основе изотермической амплификации ДНК расширяет возможности молекулярной диагностики инфекций, включая создание тестов, выполняемых в автоматизированном режиме в формате «point-of-care».

МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ НА ОСНОВЕ БИОЧИПОВ В 96-ЛУНОЧНЫХ ПЛАНШЕТАХ

Рубцова М.Ю.¹, Филиппова А.А.¹, Кузина Е.С.², Фурсова Н.К.², Уляшова М.М.¹, Преснова Г.В.¹, Григоренко В.Г.¹, Егоров А.М.¹

¹ Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия

Введение. Глобальное распространение мульти- и пан-резистентных бактерий, устойчивых к действию нескольких или практически всех классов антимикробных препаратов, является одной из угроз национальной безопасности. Лечение нозокомиальных инфекций существенно осложнилось в связи с распространением грамотрицательных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, у которых имеются мультикопийные плазмиды с несколькими приобретенными генами бета-лактамаз разных типов и классов. Для определения генов антибиотикорезистентности и их экспрессии у мультирезистентных бактерий необходима разработка новых методов молекулярной диагностики, позволяющих количественно определять концентрации нуклеиновых кислот. Данные методы должны характеризоваться высокой мультиплексностью и производительностью. В настоящее время для этих целей используются полуколичественные методы на основе ПЦР-РВ с использованием внутренних контролей, в которых: изменение экспрессии изучаемого гена определяется по отношению к уровню экспрессии контрольного гена (генов).

Цель работы заключалась в разработке метода мультиплексного количественного определения мРНК клинически значимых бета-лактамаз с использованием биочипов, расположенных в 96-луночном планшете. Для обеспечения количественного определения предложен классический подход биоаналитической химии — определение мРНК по градуировочной кривой, построенной с использованием стандартных образцов мРНК той же специфичности.

Методы исследования. В качестве объектов исследования выбраны четыре типа бета-лактамаз: СТХ-М (субкластер СТХ-М-1, молекулярный класс А), ТЕМ (молекулярный класс А), NDM (молекулярный класс В) и OXA (субкластер OXA-48, молекулярный класс D). Стандартные образцы мРНК, соответствующих полноразмерным генам выбранных бета-лактамаз, получали из плазмидной ДНК лабораторных штаммов *E. coli* — продуцентов рекомбинантных бета-лактамаз, методом транскрипции *in vitro* с использованием ДНК-зависимой РНК-полимеразы T7 [1].

Метод определения специфичных мРНК на биочипах включает несколько этапов: выделение общей РНК из бактериальной культуры; получение первой цепи кДНК в реакции мультиплексной обратной транскрипции; мультиплексная амплификация генов бета-лактамаз с введением биотиновой метки; гибридизация меченой ДНК-мишени на биочипах с иммобилизованными специфическими олигонуклеотидными зондами [1]. Биотин в составе дуплексов ДНК выявляется конъюгатом стрептавидин-пероксидаза. Далее проводится детекция пероксидазы с образованием в определенных зонах биочипа нерастворимого окрашенного продукта. Аналитическим сигналом метода является интенсивность окраски зоны биочипа, которая пропорциональна концентрации мРНК соответствующей бета-лактамазы в образце РНК.

Принцип количественного определения мРНК на биочипах заключается в параллельном анализе стандартных синтетических образцов мРНК бета-лактамаз с известными концентрациями и исследуемых транскриптов бактериальных клеток. Количественное определение мРНК в бактериальных культурах проводится по градуировочным кривым (зависимость интенсивности окрашивания зон биочипа от концентрации мРНК), построенным по результатам тестирования стандартных образцов мРНК генов бета-лактамаз каждого типа.

Основные результаты. В работе были оптимизированы условия отдельных стадий пробоподготовки меченых биотином ДНК-мишеней бета-лактамаз выбранных типов, условия их гибридизационного анализа на биочипах в лунках планшетов и алгоритмы количественной обработки аналитических сигналов для построения градуировочных зависимостей с использованием стандартных образцов мРНК [1]. В результате разработан метод одновременного определения концентраций мРНК генов четырех клинически значимых бета-лактамаз (ТЕМ-, СТХ-М-1-, NDM- и OXA-48-типов). Выбор последовательностей специфичных олигонуклеотидных зондов для одновременного определения исследуемых генов и оптимизация разных этапов анализа обеспечили снижение

предела обнаружения мРНК и увеличение коэффициента чувствительности.

Метод применен для анализа индукции генов бета-лактамаз у клинических штаммов *Enterobacteriaceae* с разной устойчивостью к антибиотикам. Показана возможность высокоспецифичного одновременного определения мРНК генов бета-лактамаз четырех типов, индуцированных действием бета-лактамов в концентрациях, соответствующих используемым в клинической практике.

Заключение. Технология биочипов с использованием стандартных образцов мРНК обеспечивает мультиплексное количественное определение мРНК генов бета-лактамаз разных типов с высокой чувствительностью и селективностью. Преимуществом использования стандартных образцов мРНК, проходящих все стадии анализа вместе с исследуемыми образцами, является отсутствие необходимости определения эффективности отдельных стадий пробоподготовки (обратной транскрипции и ПЦР), что требуется при количественном определении уровней экспрессии генов методом ПЦР-РВ. Дизайн биочипов в 96-луночных планшетах позволяет существенно увеличить воспроизводимость ре-

зультатов и производительность метода (одновременно на одном планшете можно провести анализ 42 образцов РНК-транскриптов).

Разработанный метод применим для определения концентраций специфичных мРНК бета-лактамаз у клинических штаммов *Enterobacteriaceae*, культивированных в присутствии бета-лактамовых препаратов в широком диапазоне концентраций. Биочипы для количественного определения специфичных мРНК могут быть использованы для изучения механизмов формирования устойчивости бактерий к антибиотикам и поиска новых способов подавления экспрессии бета-лактамаз.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова 123032300028-0 и Отраслевой программы Роспотребнадзора.

Литература

1. Рубцова М.Ю., Филиппова А.А., Фурсова Н.К., Григоренко В.Г., Преснова Г.В., Уляшова М.М., Егоров А.М. Количественное определение мРНК бета-лактамаз в РНК-транскриптах резистентных к антибиотикам бактерий с использованием колориметрических биочипов. Журнал аналитической химии, 2022, 77, 5, 393-405.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ В ИЗОЛЯТАХ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ В РАМКАХ ВЕТЕРИНАРНОГО МОНИТОРИНГА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Макавчик С.А.^{1*}, Кротова А.Л.², Бочарова Д.В.³

^{1*} ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия, groza81@mail.ru

² Северо-Западная испытательная лаборатория ФГБУ «ВНИИЗЖ» Санкт-Петербург, Россия

³ Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, механизмы резистентности, антибиотикорезистентность, крупный рогатый скот, микробиологические методы, полимеразная цепная реакция, секвенирование

DETECTION OF BETA-LACTAMASE GENES IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLATES ISOLATED AS PART OF VETERINARY MONITORING OF ANTIBIOTIC RESISTANCE

Makavchik S.A., Krotova A.L., Bocharova D.V.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, resistance mechanisms, antibiotic resistance, cattle, microbiological methods, polymerase chain reaction, sequencing

Цель — оценить распространенность генов бета-лактамаз кластеров CTX-M, TEM и SHV среди бактерий *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из образцов молока коров при маститах в рамках ветеринарного мониторинга антибиоткорезистентности.

Идентификацию возбудителей осуществляли с помощью тест-системы ar1 20E (bioMérieux SA, Франция). Чувствительность к антибиотикам выявляли при помощи диско-диффузионного метода. Интерпретация результатов

проводилась с применением рекомендаций EUCAST, версия 10.0. Выявление генов бета-лактамаз проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Положительные результаты выборочно подтверждали секвенированием на генетическом анализаторе Нанофор 05 (ИАП РАН, Россия). Данные секвенирования анализировали в программе ДНК анализ v.4.0.4.3 (ИАП РАН, Россия).

В период с 2021 по 2022 год из маститного молока коров было выделено 101 штамм микроорганизмов. Получен-

ные штаммы были идентифицированы как *Kl. pneumoniae* в 6% случаях выделения. Выделенные клинически значимые изоляты характеризовались резистентностью к аминогликозидам (гентамицину и тобрамицину) ($n=3$). К цефалоспорином I поколения (цефалексин) устойчивы 6 изолятов ($n=6$), к цефалоспорином II поколения (цефуросим) 3 изолята ($n=3$). Определена высокая резистентность *Kl. pneumoniae* ($n=5$) к

группе цефалоспоринов III поколения. В изученных изолятах *Kl. pneumoniae* обнаружены гены SHV, а также СТХ-M1.

Отмечен высокий уровень резистентности к бета-лактамам среди зоонозных бактерий, выделенных из молока коров с маститами, является важной частью в рамках ветеринарного мониторинга антибиотикорезистентности.

СОЗДАНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ CD-ДНК-КОНЬЮГАТОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Филатов П.В.^{1,2}, Горбенко Д.А.^{1,2}, Дададжанов Д.Р.², Ведерникова А.А.², Вартамян Т.А.²

¹ Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург

² Международный научно-образовательный центр физики наноструктур, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Введение. На сегодняшний день госпитальные (нозокомиальные) инфекции являются критической проблемой всемирного здравоохранения, так как они приводят к повышению уровня смертности и наносят существенный финансовый ущерб [1]. В благополучных странах на долю заболеваний, вызванных госпитальными инфекциями, приходится около 7% зарегистрированных случаев от общего числа, поступивших в больницы, в то время как в развивающихся странах этот показатель достигает 10% [2].

Своевременное выявление очага инфекций позволяет оперативно вмешаться и провести целенаправленное лечение, тем самым минимизируя их негативные последствия. В связи с необходимостью обнаружения госпитальных инфекций на данный момент существует несколько стратегий проведения диагностики. Одним из основных направлений детекции являются различные посевы на питательные среды (например, на селективные питательные среды). Это крайне чувствительные, но в то же время длительные методы, который требуют более 2 суток для проведения теста, из-за чего нельзя называть их своевременными. По этой причине одна из наиболее перспективных стратегий обнаружения — использование быстрых и эффективных молекулярных методов. Но и они имеют ряд критических недостатков. Так самый распространенный молекулярный метод обнаружения — полимеразная цепная реакция имеет высокую стоимость необходимых реагентов и оборудования и требования к высококвалифицированным работникам [3]. В связи с этим необходимо разработать новые диагностические тесты, лишённые этих недостатков, но при этом сопоставимые существующим методам по селективности и чувствительности.

В данной работе представлена методика обнаружения возбудителей нозокомиальных инфекций, которая сочетает подходы в области молекулярной диагностики и нанопотоники, дополняющих друг друга, делая систему перспективной благодаря сочетанию скорости и стоимости отдельно взятой реакции. В качестве молекулярной части используются чувствительные и селективные ДНК-конструкции на основе G-квадруплекса (в дальнейшем — DNA-G4), способные расплетать уникальные двуцепочечные последовательности патогенных микроорганизмов (в дальнейшем — аналиты) [4]. Для увеличения предела чувствительности используются ме-

тоды амплификации сигнала, в частности, углеродные точки (CD), к которым пришиваются части DNA-G4. В качестве аналита была выбрана последовательность генома патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), которая является одним из основных возбудителей нозокомиальных инфекций.

В присутствии аналита происходит сборка DNA-G4, которая формирует G-квадруплекс/геминовый комплекс, катализирующий окисление люминола, что вызывает хемилюминесцентный сигнал. CDs сеть формирует оптимальное микроокружение для G-квадруплекс/геминового комплекса, благодаря чему сигнал амплифицируется, увеличивая интенсивность хемилюминесценции по сравнению с пробами без CDs [5].

Цель и задачи:

1. Смоделировать структуру нескольких DNA-G4, провести тестирование и выбрать оптимальную.
2. Оптимизировать условия пришивки олигонуклеотидов к CDs.
3. Оптимизировать условия протекания реакции хемилюминесценции.

Материалы и методы.

Оборудование: The H11890 (Hamamatsu), кварцевая кювета, Zetasizer Nano ZS.

Реактивы: олигонуклеотиды (ЕвроГен, Россия), H₂O₂, гемин, NaOH, люминол, лимонная кислота, этилендиамин, бутанол, изопропанол, четыреххлористый углерод, ксилол, метанол, хлороформ, толуол.

Методы: электрофорез, автоклавирование, работа со счетчиком фотонов, динамическое светорассеяние для характеристики CD.

В качестве целевой последовательности (аналита) был выбран уникальный участок гена субъединицы A АТФ-зависимой нуклеазы, характерный для *S. aureus*. В исследовании использовалась синтезированная последовательность нуклеотидов.

Результаты. В результате работы была выбрана наиболее эффективная DNA-G4 и произведена пришивка к CD. Была исследована кинетика хемилюминесценции с использованием CDs и без них. В зависимости от условий протекания реакции было выявлено, что интегральное значение хемилюминесценции за первую минуту проте-

кания реакции с CD-DNA-G4 композицией в присутствии анализатора была выше более чем в 3 раза, по сравнению с фоновым перекисным усилением сигнала с DNA-G4 без CD.

Заключение. Предложенный метод обнаружения показал себя более эффективным, чем DNA-G4 без какой-либо модификации. Сохраняя скорость обнаружения уникального участка генома *S. aureus*, композиция смогла стабилизировать пероксидазную реакцию, благодаря чему уровень люминесценции был увеличен в несколько раз, не повышая фоновый сигнал. Такие результаты свидетельствуют о перспективности предлагаемой методики. Также, поскольку в основе лежат DNA-G4 успешно показавшие себя при работе с ДНК и РНК патогенных бактерий [4], в дальнейших исследованиях планируется проверить работу системы при титровании биологических образцов.

Авторы выражают благодарность Министерству образования и науки Российской Федерации за № FSER-2022-0009 и программе «Приоритет-2030».

ВАРИАНТЫ КОМБИНИРОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ СРЕДСТВАМ У НЕКОТОРЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Саперкин Н.В., Широкова И.Ю., Сергеева А.В., Сенина М.Д.

Приволжский исследовательский медицинский университет (ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России), Нижний Новгород, Россия

Введение. В условиях ожоговых стационаров распространение генов резистентности к антимикробным препаратам приобретает особое клиническое, микробиологическое и эпидемиологическое значение. Успешный эпидемиологический надзор за инфекциям в медицинских организациях этого типа теснейшим образом связан с адекватностью антибиотикотерапии и профилактикой эпидемической заболеваемости, в т.ч. внутрибольничного характера. Цель исследования предполагала комплексную характеристику резистентности актуальных возбудителей ИСМП на примере культур *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*.

Материалы и методы. Проведено дескриптивное эпидемиологическое исследование на базе Университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета. Охарактеризованы 4 клинических штамма *K. pneumoniae* и 2 штамма *P. aeruginosa*, полученных от 6 пациентов в возрасте, по медиане, 50 лет, МКИ 34-66 лет (4 мужчина и 2 женщины). Видовая идентификация микроорганизмов выполнялась на масс-спектрометре MALDI-TOF MS (Германия). Изучение чувствительности к антибактериальным препаратам проводилось на бактериологическом анализаторе Vitek 2. Распространенность генов резистентности определяли с применением наборов реагентов «АмплиСенс MDR MBL-FL; MDR Acinetobacter OXAFL» и «Литех» (Россия) для выделения генов резистентности методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Для

Источники литературы:

1) Booth, N. and Smith, A. S., [Infrared Detectors], Goodwin House Publishers, New York & Boston, 241-248 (1997).

2) Khan H. A., Baig F. K., Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance //Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. — 2017. — Т. 7. — №. 5. — С. 478-482.

3) Váradi L. et al. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future //Chemical Society Reviews. — 2017. — Т. 46. — №. 16. — С. 4818-4832.

4) Gorbenko D. A. et al. DNA nanomachine for visual detection of structured RNA and double stranded DNA // Chemical Communications. — 2022. — Т. 58. — №. 35. — С. 5395-5398.

5) Kumari S., Mandal S., Das P. Carbon dot mediated G quadruplex nano-network formation for enhanced DNAzyme activity and easy catalyst reclamation //RSC advances. — 2019. — Т. 9. — №. 71. — С. 41502-41510.

изучения чувствительности бактерий препараты бактериофагов, равно как и дезинфицирующие средства, использовались от разных производителей. В качестве дезинфектантов использовались средства следующих рецептур: ЧАС 16,4%, ПГМГ, муравьиная кислота (обозначено как ДС1); ЧАСы 20%, ПАВ (обозначено как ДС2). Оба дезинфектанта в режиме 0,2% — 30 минут, результат выражали как среднее число КОЕ. Обработка данных проводилась в среде R(Rstudio 1.1.463).

Результаты. Базой для исследования послужил ожоговый стационар Университетской клиники, который объединяет детское и взрослое отделения. С клинической точки зрения, здесь оказывается помощь лицам с достаточно серьезными состояниями, в частности, термическими ожогами нескольких областей тела 2-3 степени, в т.ч. производственные травмы (тушение пожара и пр.). Микробиологический мониторинг подразумевал вместе с характеристикой микробного пейзажа комплексную оценку фенотипической (предварительная оценка) и генотипической антибиотикорезистентности (углубленная оценка). В данной работе мы наблюдали присутствие одновременной устойчивости к различным антибактериальным средствам у некоторых штаммов грамотрицательных бактерий с множественной лекарственной резистентностью — *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. Наличие генов антибиотикорезистентности (OX-48, CTX-M; гены VIM и NDM не обнаружены) в большинстве случаев сопровождалось потерей чувствительности к бактериофагам, а также снижением чувстви-

тельности бактерий к дезинфицирующим средствам, содержащим ЧАСы (неполное бактерицидное и суббактерицидное действие дезсредства), вплоть до наличия сформированной устойчивости. Тем не менее, законо-

мерности возникновения комбинированной устойчивости у штаммов, резистентных к антибиотикам, требует дальнейшего детального изучения на молекулярно-генетическом уровне.

ТАБЛИЦА. КОМБИНИРОВАННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ У НЕКОТОРЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Культура	Антибиотики		Бактериофаги			Дезинфектанты	
Клебсиеллы							
<i>K. pneumoniae</i> (69)	ОХА-48	СТХ-М	Пио НН – У	Клебс НН – У		ДС1 – РН	ДС2 – РН
<i>K. pneumoniae</i> (134/1)	ОХА-48	СТХ-М	Пио НН – Ч	Клебс НН – Ч		ДС1 – 3 КОЕ	ДС2 – РН
<i>K. pneumoniae</i> (231)	ОХА-48	СТХ-М	Пио НН – Ч	Клебс Уфа – Ч		ДС1 – 8 КОЕ	ДС2 – 3 КОЕ
<i>K. pneumoniae</i> (297/1)	ОХА-48	СТХ-М	Пио НН – Ч	Клебс Уфа – Ч		ДС1 > 300КОЕ	ДС2 – 140 КОЕ
Синегнойные палочки							
<i>P. aeruginosa</i> (234)	Гены VIM, NDM не обнаружены Пио НН – Ч		Пио НН – У	Интести НН – У	Псевдомон НН – У	ДС1 – 2 КОЕ	ДС2 – РН
<i>P. aeruginosa</i> (217)			Интести НН – У	Псевдомон НН – Ч	ДС1 – 3 КОЕ	ДС2 – РН	

Примечание: У — устойчивый; Ч — чувствительный. Названия препаратов фагов дано вместе с городом-производителем: Пио — пиобактериофаг поливалентный; Интести — интести-бактериофаг; Клебс — бактериофаг клебсиелл поливалентный; Псевдомон — псевдомонадный поливалентный.

Заключение. Штаммы *P. aeruginosa*, полученные от пациентов с ожогами, характеризовались распространенной резистентностью к антибиотикам. Более половины изученных культур проявляли устойчивости по отношению к 6 классам антибиотиков (всего 11 препаратов): цефалоспорины I, IV поколений; аминогликозиды I-III поколений; фторхинолоны; карбапенемы, активные в отношении внутрибольничных штаммов. Эти варианты синегнойной палочки обладали фенотипическими признаками продукции металло-β-лактамаз. Штаммы *K. pneumoniae* отличались существенной антибиотикорезистентностью: 96,2% культур резистентны к цефтазидиму, 78,4% — цефтазидим-клавуланату, 21,1-33,8% (по разным препаратам) были устойчивы к карбапенемам. Подтверждением этому стала детекция соответствующих генов резистентности: β-лактамазы до 71,43%, в сочетании с другими элементами

или изолированно, у некоторых штаммов. Особого внимания заслуживают факты идентификации у бактериальных возбудителей признаков комбинированной устойчивости к антимикробным препаратам (антибиотики, литические бактериофаги, дезинфектанты). Эта особенность некоторых штаммов возбудителей инфекции обсуждается достаточно давно. Учитывая большое микробиологическое и эпидемическое значение этого феномена, представляется целесообразным организация надлежащего лабораторного обеспечения при проведении микробиологического мониторинга (напр., выборочно, с учетом эпидемиологической ситуации в конкретной медицинской организации). В настоящее время Университетская клиника на постоянной основе ведет базу данных по возбудителем ИСМП с депонированием информации по значимым антимикробным средствам.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ КАРБАПЕНЕМ-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* В ОТДЕЛЕНИИ ХИРУРГИИ

Билалова А.Б.¹, Лавриненко А.В.², Кадырова И.А.²

¹ Магистрант НАО МУК, кафедра Института наука о жизни, по специальности Биолог-исследователь, 2 курс.

² Научно-исследовательская лаборатория Института наук о жизни, Медицинский университет Караганды, Казахстан

Цель. Определить распространение карбапенем-устойчивых штаммов *Klebsiella pneumoniae* в отделении хирургии стационаров г. Караганды в период с 2020 по 2022 гг.

Материалы и методы. Для изучения были взяты 66 штаммов (n=66) *K. pneumoniae*, выделенные в стационарах

г. Караганды, в частности от пациентов отделения хирургии, в период с 2020 по 2022 гг. Идентификация микроорганизмов проводилась с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии (Microflex-LT, Biotyper System, Bruker Daltonics, Германия). Ввод данных осуществлялся в программе

WHONET (version 5.6). Чувствительность изучаемых штаммов бактерий к антимикробным препаратам была определена с помощью диско-диффузного метода и интерпретирована в соответствии с EUCAST (version 12). В качестве фенотипического метода определения карбапенемаз был использован метод Hodge test. Для определения генов резистентности использовали ПЦР в реальном времени (CFX96), наборы «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48FL», «АмплиСенс MDR MBL-FL». Обработка полученных данных проводилась на онлайн платформе AMRcloud.

Результаты. Штаммы *K. pneumoniae* были выделены в 27% (n=18) случаях из гнойного материала, 39% (n=26) из дыхательных путей, а так же в 34% (n=22) случаях из разных жидкостей организма. 63,6% (n=42) штаммов *K. pneumoniae* б18и устойчивы к меропенему и имипенему (95% ДИ 33,65-51,32). Фенотипическим методом Hodge test было получено

22 штамма (52,4%) *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы. Штаммы *K. pneumoniae*, выделенные из отделения хирургии стационаров г. Караганды обладали следующими генами резистентности: NDM (50%) и OXA-48 (50%). У остальных 13 штаммов механизмы устойчивости не были обусловлены исследуемыми генами резистентности.

Выводы. В данном исследовании штаммы *K. pneumoniae* обладали высоким уровнем резистентности к препаратам группы карбапенема (63,6%). Исследуемые штаммы характеризуются следующими генами устойчивости: NDM и OXA-48. Гены резистентности OXA-48 и NDM представляет собой серьезную клиническую проблему во всех стационарах Казахстана, России, Европы. Особую настороженность вызывает совместное присутствие обоих видов резистентности у бактерий, которое усугубляет состояния пациентов хирургических отделений.

СИНЕРГЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ, БАКТЕРИОФАГОВ И ПОЛИСАХАРИД-ДЕПОЛИМЕРАЗЫ НА БИОПЛЕНКИ И ПЛАНКТОННЫЕ КЛЕТКИ KLEBSIELLA PNEUMONIAE

Городничев Р.Б., Кривуля А.О., Корниенко М.А., Зайчикова М.В., Малахова М.В., Шитиков Е.А.

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. М.Ю. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

Ключевые слова: *K. pneumoniae*, меропенем, тетрациклин, бактериофаги, синергия

SYNERGISTIC EFFECTS OF ANTIBIOTICS, BACTERIOPHAGES AND POLYSACCHARIDE DEPOLYMERASE ON BIOFILMS AND PLANKTONIC CELLS OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE

Gorodnichev R.B., Krivulya A.O., Kornienko M.A., Zaychikova M.V., Malakhova M.V., Shitikov E.A.

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Keywords: *K. pneumoniae*, meropenem, tetracycline, bacteriophages, synergy

Введение. Необходимость новых подходов к терапии устойчивых к антибиотикам штаммов *K. pneumoniae* нарастает вслед за увеличением доли резистентных изолятов в популяции. Терапия вирулентными бактериофагами и их производными является одной из альтернативных стратегий борьбы с устойчивыми к антибиотикам *K. pneumoniae* и их биопленками. В настоящий момент в клинической практике антибиотики и бактериофаги применяются совместно, однако не прекращается дискуссия относительно повышения эффективности комбинирования данных антимикробных препаратов.

Цель и задачи. Целью настоящего исследования было оценить синергетическое действие антибиотиков и бактериофагов или рекомбинантной полисахарид-деполимеразы на планктонные клетки и биопленки *K. pneumoniae*.

Материалы и методы. В работе использовались 6 штаммов *K. pneumoniae* (2 штамма с капсульным типом KL19, 3 штамма с капсульным типом KL23 и один с капсульным типом KL20) и 6 фагов различных родов (5 с капсульной спец-

ифичностью и 1 с неизвестным сайтом адсорбции). Полисахарид-деполимераза фага Dlv622 (KL23 специфичный) была получена в виде рекомбинантного белка Dep622. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для антибиотиков (гентамицин, тетрациклин, меропенем и левофлоксацин) устанавливались методом микроразведений согласно CLSI. Для моделирования комбинированного воздействия бактериофага или рекомбинантной полисахарид-деполимеразы и антибиотика штаммы бактерий инкубировали в 96 луночных планшетах в присутствии антибиотика в концентрации 0,5 МИК и бактериофага в концентрации 0,1 лизирующей по Аппельману или рекомбинантной полисахарид-деполимеразы в концентрации 100 минимально действующей концентрации. Эффектом синергии считалось снижение оптической плотности бактериальной суспензии (620 нм) при воздействии комбинации антибиотик-бактериофаг или деполимераза ниже контрольных значений их индивидуального действия. Биопленки *K. pneumoniae* выращивались в течении 24 ч в 96 луночных планшетах.

Величину биопленкообразования определяли окрашиванием кристаллическим фиолетовым по стандартной методике с оценкой оптической плотности раствора красителя (575 нм). Разрушение биопленок от индивидуального и комбинированного воздействия антибиотиков и бактериофагов или деполимераз оценивали на зрелых (24 ч) биопленках по сравнению с контролем после дополнительных 24 ч инкубации в присутствии антибактериальных агентов. Биопленки подвергались воздействию антибиотиков в концентрации 1 МИК, бактериофага в концентрации 0,1 лизирующей по Аппельману или деполимеразы в концентрации 100 минимально действующей концентрации.

Основные результаты. Для планктонных клеток частота наблюдаемых случаев синергизма варьировалась в зависимости от антибиотика: 28,6% для гентамицина, 50% для левофлоксацина, 55,6% для меропенема и 70% для тетрациклина. Анализ доступных сочетаний штамм *K. pneumoniae*, антибиотик и бактериофаг или полисахарид-деполимераза показали отсутствие закономерностей в проявлении эффекта синергизма. Синергетических эффектов при сокультивировании планктонных клеток штаммов с капсульным типом KL23 с исследуемыми антибиотиками и специфичной рекомбинантной деполимеразой Дер622 также не было обнаружено.

Оценка индивидуального и синергетического воздействия бактериофагов/деполимеразы и антибиотиков на зрелые биопленки проводилась на примере одного штамма *K. pneumoniae* с капсульным типом KL23. Штамм был чувствителен к двум антибиотикам (меропенему и тетрациклину), двум бактериофагам и их рекомбинантному белку полисахарид-деполимераза Дер622. Инкубирование биопленок с тетрациклином и меропенемом в концентрации 1 МИК привело к снижению количества биопленки на

13 и 22% по сравнению с контролем соответственно. Отдельное действие монофагов и деполимеразы привело к снижению количества биопленки на 65-68%, что показывает более высокую эффективность фагов по сравнению с антибиотиками. Совместное воздействие на биопленки бактериофагами или деполимеразой и меропенемом привело к незначительному усилению разрушения биопленок до 68-73%. Напротив, при совместном действии бактериофагов и тетрациклина эффективность составила всего около 30%, что говорит о ингибировании тетрациклином фагового лизиса биопленок. Совместное воздействие на биопленки тетрациклина и деполимеразы привело к снижению количества биопленки на 55%, что значительно выше, чем индивидуальное действие тетрациклина (13%), но ниже, чем индивидуальное действие деполимеразы (66%).

Выводы. Для планктонных клеток *K. pneumoniae* не было выявлено закономерностей между наличием или отсутствием синергетического эффекта при использовании комбинаций антибиотиков и бактериофагов, что может говорить о более сложном характере воздействия антимикробных агентов на клетки бактерии. Бактериофаги и рекомбинантная полисахарид-деполимераза показали более высокую литическую активность в отношении зрелых биопленок по сравнению с антибиотиками. Синергетические эффекты в отношении лизиса биопленок были выражены слабо (сочетание с меропенемом) либо даже наблюдалось снижение эффективности при сочетанном действии (сочетание с тетрациклином). Исследование выполнено за счет средств государственного задания «Разработка комплексной схемы терапии лекарственно-устойчивых возбудителей инфекционных заболеваний с применением бактериофагов или их производных в сочетании с антибактериальными препаратами» (ШИФР: Бактериофаг-2).

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *M. HOMINIS*, ВЫЯВЛЕННЫЕ МЕТОДОМ ПРОТЕОГЕНОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ

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

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Введение. *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) является условным патогенном человека, способным вызывать острые и хронические инфекции урогенитального тракта. Внутриутробное инфицирование плода этой микоплазмой может вызывать менингит, пневмонию или абсцессы у новорожденных. Известны случаи острого и хронического пиелонефрита, вызванного *M. hominis*. Показано, что микоплазмы этого вида могут адгезироваться к клеткам крови, с током крови разноситься по органам и тканям и вызывать генерализованную микоплазменную инфекцию. Другой особенностью этой бактерии является длительная персистенция возбудителя в тканях инфицированного организма. Предполагают, что *M. hominis*, обитающая в урогенитальном тракте человека, обладает онкогенным

патенциалом и способствуют развитию имортализации, повышенной миграции и инвазии опухолевых клеток. Несмотря на редуцированный геном, очень маленький размер клетки, отсутствие клеточной стенки, *M. hominis* обладает высоким адаптивным потенциалом, позволяющим этим бактериям избегать действия иммунной системы хозяина и вызывать хроническое воспаление без очевидных клинических симптомов. Многие микоплазмы способны не только прикрепляться к эукариотическим клеткам хозяина, но и проникать внутрь этих клеток, свободно реплицироваться в них, модулировать клеточный апоптоз, не вызывая клеточной гибели.

Цель исследования. Провести сравнительный анализ 8 клинических изолятов и лабораторного штамма Н-34

M. hominis на уровне генома и протеома с целью определения новых молекулярных механизмов фенотипической перестройки и устойчивости к неблагоприятным воздействиям внутри организма хозяина.

Методы. Лабораторный штамм *M. hominis* H-34 предоставлен доктором К.Х. Лемке (Институт профилактической медицины Листара, Лондон, Великобритания). Клинические изоляты *M. hominis* были получены из биологического материала больных урогенитальными инфекциями, предоставленного доктором А. Тараскиной (НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. имени Д. О. Отта Минздрава России). Все изоляты культивировали на среде Brain Heart Infusion (BHI), дополненной 15 % лошадиной сыворотки (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), 5 % дрожжевого экстракта и 1 % L-аргинина. Колонии наблюдали с помощью светового микроскопа с объективами 40X (LETZLAR, Германия). Скорость роста определяли по количеству гДНК. Геномы лабораторного штамма и 8 клинических изолятов *M. hominis* секвенировали на Секвенаторе MGISEQ-2000 для коротких прочтений и на нанопоровом секвенаторе PromethION (Oxford Nanopore Technologies) для длинных прочтений. Для сборки геномов использовали программное обеспечение Unicycler. Геномы аннотировали с помощью программ Vasta (<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685>) и Blast (NCBI). Протеомное профилирование проводили с помощью ВЭЖХ-масс-спектрометрии с использованием системы Ultimate 3000 RSLC nano HPLC, соединенной с масс-спектрометром Q Exactive Plus. (Thermo Fisher Scientific). Количественное определение и идентификация белков выполнялись с помощью программного обеспечения Quantms/Nextflow pipeline (<https://doi.org/10.5281/zenodo.7754148>) по геному лабораторного штамма и по индивидуальным геномам клинических изолятов.

Результаты. клинические изоляты фенотипически отличаются от лабораторного штамма H-34 низкой интенсивностью роста и уменьшением размера колоний. Геномный анализ показал большое разнообразие генов в пределах одного вида: пангеном для 9 исследуемых штаммов составляет 723 белок-кодирующих генов, а коровый геном — 506. Процент уникальных для изолятов генов состав-

ляет 30%. Анализ мобильных генетических элементов показал, что лабораторный штамм содержит только вставки последовательностей генов, однако клинические изоляты, кроме этого, содержат гены фагов, вирусов, РНК-эндонуклеазу CRISPR II типа Cas9, много рекомбиназ и интеграз, а также интегративные конъюгативные элементы (ICEs), являющиеся посредниками горизонтального переноса генов. Наличие ICEs в геномах клинических изолятов имеет немаловажное значение для селективного преимущества клиническим изолятам в организме хозяина. Сниженная интенсивность скорости роста, изменяющийся фенотип колоний и данные протеомного анализа, обнаружившего снижение уровня белков клеточного деления, репликации, трансляции, свидетельствует о том, что изменение фенотипа клинических изолятов связано с функциональной перестройкой в сторону перехода их в состояние старости, подобное персистерам. Согласно протеомным данным, клинические изоляты *M. hominis* из всех возможных путей углеродного метаболизма выбирают самый энергетически невыгодный путь утилизации нуклеозидов, который позволяет им затормаживать рост и все основные клеточные процессы. Мы показали, что в отличие от лабораторного штамма H-34 у клинических изолятов растет уровень метилирующих субъединиц HsdM системы рестрикции-модификации (PM) I типа. Кроме этого, определены дополнительные компоненты PM систем в изолятах. Такое многообразие компонентов PM систем в пределах очень маленького генома поднимает вопрос о их существенной роли в процессе адаптации.

Выводы. Показано, что, будучи в организме хозяина клинические изоляты претерпевают фенотипическую перестройку, приводящую к замедлению основных клеточных процессов. Это связано с переключением углеродного метаболизма и активацией наиболее невыгодного в энергетическом плане пути утилизации нуклеозидов. Мы предполагаем, что в регуляции этого переключения может играть роль метилирование ДНК.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00189, <https://rscf.ru/project/23-24-00189/>

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ПОЛИМИКСИНАМ (КОЛИСТИНУ) В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Руденкова Т.В., Костюк С.А., Горбич Ю.Л.

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (ГУО БелМАПО), Минск, Республика Беларусь

Введение. Для лечения инфекционных процессов, обусловленных *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), применяют лекарственные средства групп аминогликозидов, карбапенемов и полимиксинов. Несмотря на тяжелые побочные эффекты при применении полимиксинов (колистина), проявляющиеся нефротоксичностью и нейротоксичностью, колестин остается ключевым компонентом комбинированных

антимикробных схем, которые рекомендованы для лечения тяжелых инфекций, обусловленных грамотрицательными микроорганизмами с множественной (MDR) и экстремальной (XDR) устойчивостью. Опираясь на практический опыт применения колестина, а также учитывая новые данные о побочных и токсических эффектах, фармакокинетику и фармакодинамику, современные схемы лечения позволя-

ют оптимизировать его использование с целью достижения максимально эффективной элиминации возбудителя при минимальных рисках для здоровья пациента [1].

Использование комбинированного подхода, включающего одновременное назначение карбапенемов и полимиксинов (колистина), при лечении сепсиса, обусловленного MDR и XDR штаммами *K. pneumoniae*, доказало свою эффективность в клинической практике, несмотря на широкое распространение генов карбапенемаз среди циркулирующих штаммов возбудителя и, соответственно, высокий уровень резистентности к карбапенемам. Однако, распространение штаммов *K. pneumoniae* которые наряду с устойчивостью к карбапенемам обладают и устойчивостью к полимиксинам (колистину) представляет собой серьезную проблему из-за ограничения вариантов лечения инфекций, обусловленных данными штаммами возбудителя [2].

Целью исследования было изучение частоты выявления молекулярно-генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы полимиксинов (колистину) в бактериальных культурах *K. pneumoniae*.

Материалы и методы. Бактериальные культуры *K. pneumoniae* были выделены из крови пациентов (n=351), находившихся на лечении в стационарах лечебных учреждений здравоохранения г. Минска, с диагнозом сепсис (n=217; 61,82%) или септический шок (n=134; 38,18%), вызванный карбапенем-резистентными изолятами *K. pneumoniae*. Среди обследованных пациентов было 209 мужчин (59,54%) и 142 женщины (40,46%). Выделенную из бактериальных культур *K. pneumoniae* РНК подвергали реакции обратной транскрипции и последующей постановке TaqMan ПЦР в режиме реального времени для амплификации генов PhoQ, PhoP, pmrK, а также rpsL гена *K. pneumoniae*, который использовали в качестве внутреннего контроля. Расчет процента уровня нормализованной экспрессии (% УНЭ) генов проводили по методу $\Delta\Delta Ct$.

Выделенную из бактериальных культур *K. pneumoniae* ДНК использовали для анализа структуры гена mgrB с применением анализа кривых плавления, электрофоретического анализа полученных ампликонов и сиквенс-анализа, а также проводили выявление приобретенных плазмидных генетических элементов резистентности к полимиксинам (колистину) — генов mcr 1-10.

Результаты. С применением метода ПЦР в режиме реального времени ДНК *K. pneumoniae* была выявлена в 348 (99,15%) бактериальных культурах, которые и были включены в дальнейшие исследования по выявлению молекулярно-генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы полимиксинов (колистину).

В ходе определения уровней нормализованной экспрессии генов PhoQ, PhoP, pmrK для ряда образцов (n=6; 1,72%) после этапа выделения РНК и спектрофотометрического исследования было установлено низкое содержание РНК в биологическом материале; для данных образцов на этапе анализа результатов ПЦР с обратной транскрипцией было зафиксировано отсутствие амплификации РНК гена внутреннего контроля (rpsL ген *K. pneumoniae*) и других исследуемых генов. Таким образом, анализ уровней экспрессии генов PhoQ, PhoP и pmrK был выполнен для 342 образцов.

При анализе процента уровня нормализованной экспрессии (%УНЭ) таргетных генов PhoQ, PhoP и pmrK в бактериальных культурах *K. pneumoniae* медиана и размах (Me (min...max)) значений составили: для гена PhoQ — 77,11 (1,56...869,39)%, для гена PhoP — 0,08 (0,00...37,83)%, для гена pmrK — 5,41 (0,00...153,57)%. После анализа полученных данных были выявлены образцы с гиперэкспрессией (%УНЭ > 100%) гена PhoQ (n=149; 43,57%) и гена pmrK (n=9; 2,63%), при этом гиперэкспрессия гена pmrK была выявлена только в сочетании с гиперэкспрессией гена PhoQ (n=9). Для гена pmrK было зафиксировано отсутствие экспрессии в 56 проанализированных образцах (16,37%), для гена PhoP отсутствие экспрессии было выявлено в 62 образцах (18,13%). Для гена PhoP не было выявлено случаев гиперэкспрессии в исследованных образцах бактериальных культур *K. pneumoniae*.

В бактериальных культурах *K. pneumoniae* (n=348) с применением метода сиквенс-анализа были выявлены изменения структуры гена mgrB в 138 образцах (39,66%). Отсутствие амплификации гена mgrB из-за делеции всего локуса данного гена было зафиксировано в 13,51% случаев (n=47). В 49 образцах (14,08%) в гене были выявлены вставки инсерционных последовательностей IS1 и IS5 (80-500 п.о.), а в 42 образцах (12,07%) в нуклеотидной последовательности гена были зафиксированы делеции части локуса гена. С использованием методов анализа кривых плавления и электрофоретического анализа, были идентифицированы изменения структуры гена mgrB в 123 (35,34%) и 107 (30,75%) образцах, соответственно.

В 348 образцах ДНК, выделенной из бактериальных культур *K. pneumoniae*, в ходе проведения исследований не было зафиксировано присутствия генов семейства mcr 1-10.

Заключение. Все образцы бактериальных культур, в которых были идентифицированы изменения структуры гена mgrB и гиперэкспрессия генов PhoQ и/или pmrK, принадлежали к колистинрезистентным изолятам (по данным бактериологического исследования). Среди изученных бактериальных культур *K. pneumoniae* были выявлены: 11 образцов, в которых были идентифицированы изменения только в уровне экспрессии генов (PhoQ и/или pmrK); 138 образцов, в которых было зафиксировано одновременное увеличение уровня нормализованной экспрессии генов (PhoQ и/или pmrK) и изменение структуры гена mgrB. Дальнейшее изучение, разработка и внедрение в лабораторную практику новых методов для выявления молекулярно-генетических маркеров антибиотикорезистентности *K. pneumoniae*, будет способствовать оптимизации и персонализации подходов к тактике выбора схем антибактериальной терапии.

Список использованной литературы:

1. Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., Carattoli, A. Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance / Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., Carattoli, A. // FEMS Microbiol Rev. — 2017. — Vol. 41(3). — P. 252-275. doi: 10.1093/femsre/fux013. PMID: 28521338.
2. Agents of Last Resort: An Update on Polymyxin Resistance / Q. Yang [et al.] // Infect Dis Clin North Am. — 2020. — Vol. 34, № 4. — n P.723-750. doi:10.1016/j.idc.2020.08.003

ПРЕДСКАЗАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ К АНТИБИОТИКАМ ПО СПЕКТРАМ MALDI TOF ПРИ ПОМОЩИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

Гречишникова Д.А.^{1,2}

¹ Физический факультет Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

² Компания ScienceAI, Москва, Россия

Введение. Раннее применение эффективных антимикробных препаратов имеет решающее значение для успешного лечения. Определение устойчивости к ним позволяет подобрать оптимальную терапию, однако существующие методы на основе культивирования требуют до 72 часов для получения результатов [1]. Мы разработали новый подход для прогнозирования устойчивости к антибиотикам на основе спектров, полученных с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF). Предложенный метод представляет собой ансамбль нейронных сетей с архитектурой Трансформер, лежащей в основе современных больших языковых моделей. Мы обучили модель на общедоступной базе данных профилей масс-спектров клинических изолятов с известными фенотипами чувствительности к антимикробным препаратам. Модель демонстрирует высокую точность в определении штамма и устойчивости к антибиотикам пяти бактериальных патогенов, а именно *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*. В настоящее время клинические лаборатории уже используют масс-спектры MALDI-TOF для идентификации микроорганизмов, однако дальнейшее определение их устойчивости к антибиотикам обычно требует применения культуральных методов. Предложенный метод может выявлять устойчивость на этапе первичной идентификации, что существенно сокращает время исследования и позволяет назначить адекватную терапию на 70-90% быстрее, чем в случае применения культурального метода.

Цели. Разработка нейронной сети на основе архитектуры Трансформер для предсказания устойчивости бактерий к антибиотикам по MALDI-TOF спектру.

Задачи. Предобработка спектров, адаптация архитектуры Трансформер, построение ансамбля нейронных сетей, обучение и оценка итоговой модели.

Методы. Для обучения модели мы использовали набор спектров DRIAMS [2], находящийся в открытом доступе. Он содержит более 300 000 предварительно обработанных и бинаризованных спектров. Каждый спектр представлен вектором фиксированной размерности (6000 чисел). Мы сортировали пики в порядке уменьшения интенсивности. На вход модели подавали два вектора — вектор из 256 наиболее интенсивных пиков и вектор из соответствующих им позиций на бинаризованной оси m/z . Набор данных разделили на два множества (для обучения и для тестирования) в пропорции 80:20. Разделение было произведено таким образом, чтобы сохранить соотношение классов, представленное в исходном наборе данных.

Обучение проходило в два этапа. На первом — сеть училась определять штамм бактерии. На втором — для

каждого штамма и каждого типа антибиотика обучалась отдельная нейронная сеть, относящая образец к чувствительному или устойчивому классу. На обоих этапах мы использовали один тип архитектуры — энкодер Трансформера, состоящий из 4 слоев с размерностью 16 и 2 голов внимания. Модели обучали при помощи AdamW оптимизатора с циклически изменяющимся (в диапазоне 0.0001-0.001) коэффициентом скорости обучения. Размер батча составил 8 образцов. После обучения нейронные сети были объединены в итоговую модель, которая принимает на вход спектр, определяет штамм бактериального патогена, а затем, в зависимости от штамма, предсказывает устойчивость к релевантным для данного штамма антибиотикам.

Так как в наборе данных имел место дисбаланс классов для оценки качества моделей использовались следующие метрики: f1 мера, точность (precision), чувствительность (recall) и площадь под ROC кривой.

Для написания кода был использован язык Python (3.9.13). Для построения, обучения и оценки моделей были использованы библиотеки PyTorch (2.0) и Sklearn (1.0.2).

Результаты. Предложенная модель с высокой точностью определяет штамм и устойчивость к антибиотикам пяти бактериальных патогенов: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Наиболее эффективно алгоритм предсказывал устойчивость *Staphylococcus aureus* к оксациллину ($f1 = 0.97$), *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* к цефтриаксону ($f1 = 0.95$ и 0.97 соответственно), *Staphylococcus epidermidis* к амоксициллину ($f1 = 0.87$), *Pseudomonas aeruginosa* к цефепиму ($f1 = 0.86$). Наименьшие значения метрик качества модель показала при предсказании устойчивости *Staphylococcus aureus* к эритромицину ($f1 = 0.84$), *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* к ципрофлоксацину ($f1 = 0.84$ и 0.87 соответственно), *Staphylococcus epidermidis* к гентамицину ($f1 = 0.83$), *Pseudomonas aeruginosa* к цефтазидиму ($f1 = 0.81$). Использование нейронных сетей на базе архитектуры Трансформер позволило значительно улучшить метрики качества по сравнению с моделями градиентного бустинга (XGBoost, CatBoost, LightGBM) и многослойным перцептроном. Значение целевой метрики $f1$ увеличилось на 9%, 12%, 15% и 3% соответственно.

Выводы. В данном исследовании мы продемонстрировали, что масс-спектрометрия MALDI-TOF в сочетании с машинным обучением имеет потенциал для использования в клинической практике. Наш подход дает возможность достаточно точно определить устойчивость бактериального патогена к антибиотикам в короткие сроки (на 70-90% быстрее, чем при применении культурального метода). Метод позволит назначить адекватную терапию быстрее, повысить вероятность выздоровления, предот-

вратить развитие антибиотикорезистентности у пациента, а также сократить затраты на реактивы и расходные материалы.

Литература.

[1] Weis, C. V., Jutzeler, C. R. & Borgwardt, K. Machine learning for microbial identification and antimicrobial

susceptibility testing on MALDI-TOF mass spectra: a systematic review. *Clin. Microbiol. Infect.* 26, 1310–1317 (2020).

[2] Weis, C., Cuénod, A., Rieck, B. et al. Direct antimicrobial resistance prediction from clinical MALDI-TOF mass spectra using machine learning. *Nat Med* 28, 164–174 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01619-9>

КЛОНАЛЬНЫЙ СОСТАВ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* С ПРОДУКЦИЕЙ МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ С ИНФЕКЦИЕЙ КРОВотоКА И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Хрульнова С.А.¹, Фёдорова А.В.¹, Фролова И.Н.¹, Ликольд Е.Б.¹, Молчанова И.В.², Ветохина А.В.³, Куцевалова О.Ю.⁴, Клясова Г.А.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² БУЗ Иркутская областная клиническая больница, Иркутск, Россия

³ БУЗ Челябинская областная клиническая больница, Челябинск, Россия

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, Россия

Введение: *Pseudomonas aeruginosa* — один из наиболее значимых внутрибольничных патогенов, вызывающих инфекции кровотока с высокой летальностью. Наибольшее клиническое и эпидемиологическое значение имеют штаммы *Paeruginosa* с продукцией металло-β-лактамаз (МБЛ). В большинстве случаев штаммы с множественной и экстремальной устойчивостью относятся к «клонам высокого риска». Также следует отметить, что одним из наиболее известных механизмов вирулентности *P. aeruginosa* является система секреции III типа (Т3SS), ответственная за секрецию экзоферментов (Ехo) U, S, T и Y.

Цель и задачи: Изучить генетическое разнообразие МБЛ-продуцирующих *Paeruginosa*, выделенных из гемокультуры от больных с инфекцией и гематологическими заболеваниями, и оценить распределение генов вирулентности *exoU*, *exoS*, *exoT*, *exoY*.

Материалы и методы: Материалом исследования были изоляты *Paeruginosa*, выделенные из гемокультуры от больных, находившихся на стационарном лечении в 4 лечебных учреждениях России (2003–2022 гг.). Чувствительность изолятов *Paeruginosa* к карбапенемам оценивали согласно критериям CLSI (2022). Наличие генов металло-β-лактамаз класса В (групп *bla*_{IMP}, *bla*_{VM} и *bla*_{NDM}) определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов. Для характеристики клональной структуры популяции был использован метод мультислокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) (<https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa/>). Наличие генов *exoU*, *exoS*, *exoT*, *exoY* определяли методом мультиплексной ПЦР.

Основные результаты: Всего было исследовано 444 изолята *Paeruginosa*, из которых 173 (39%) были нечувствительными к меропенему и/или имипенему. Гены приобретенных МБЛ были обнаружены у 41,6% (72 из 173) карбапенем-нечувствительных штаммов. Гены группы *bla*_{VM} были доминирующими, их доля составила 98,6% (71 из 72). Только

у одного штамма были выявлены гены карбапенемаз группы IMP (1,4%). Гены группы *bla*_{NDM} не были обнаружены.

Методом МЛСТ среди 72 карбапенемазопродуцирующих *Paeruginosa* было выявлено 10 уникальных сиквенс-типов (ST). В структуре популяции доминировал сиквенс-тип ST235 (63,9%, 46 из 72), относящийся к «клонам высокого риска», далее следовали ST654 (n=10; 13,9%) и ST234 (n=8; 11,1%). К ST164 принадлежало 2 (2,8%) штамма, к сиквенс-типам ST9, ST111, ST261, ST319, ST1800, ST4330 — по одному (по 1,4%) штамму. Впервые нами был определен и зарегистрирован в Международной базе сиквенс-тип ST4330 с новым аллельным вариантом гена *acsA* (306), который является однолокусным вариантом «клона высокого риска» ST654, занимающего вторую позицию (13,9%) в структуре исследуемой нами популяции *Paeruginosa*.

Гены вирулентности *exoU* были обнаружены у 65,3% (47 из 72) изолятов и принадлежали к 2 сиквенс-типам (ST235 и ST319), а *exoS* были у 34,7% (25 из 72) *Paeruginosa* и относились к 8 сиквенс-типам. Наличие генов вирулентности *exoS* было ассоциировано с ST654 и ST234, в то время как *exoU* — с ST235 (p<0,0001). Ген *exoT* несли все штаммы *Paeruginosa*, ген *exoY* — 98,6% (71 из 72). Ген *exoY* отсутствовал у штамма, принадлежащего к новому ST4330 в отличие от ST654.

Заключение: Доля карбапенем-резистентных *Paeruginosa*, выделенных из гемокультуры от больных с инфекцией кровотока и гематологическими заболеваниями, составила 39%, среди которых гены приобретенных МБЛ были выявлены у 41,6%. Доминирующую позицию занимал «клон высокого риска» ST235 (63,9%), выявлен новый ранее незарегистрированный ST4330. Гены вирулентности *exoU*, ассоциированные с высоковирулентным фенотипом и неблагоприятным прогнозом у пациентов с пневмонией и бактериемией, были детектированы у всех штаммов ST235, а гены *exoS* — среди ST654 и ST234.

MOLECULAR CHARACTERISTIC ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN DIARRHEAGENIC *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED FROM RESIDENTS OF THE REPUBLIC OF GUINEA

Balde R.¹, Makarova M. A.², Zhamborova M. Kh.², Polev D. E.², Saitova A. T.²

¹ Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea

² Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russian Federation

Introduction. In recent decades, the adverse effect on human health has been associated not only with the emergence of «new» infections or the return of «old» ones, but also with the phenomenon of resistance of infectious agents to antibiotics, resulting in a sharp decrease in clinical efficiency of etiotropic medicinal therapy of infectious diseases. Widespread diseases including diarrheal diseases are becoming increasingly incurable due to the development and growth of antimicrobial resistance. Problems with the burden of diarrheal diseases include a lack of data on antibiotic resistance, especially *E. coli*, the most common cause of acute diarrhea in the African Region.

Aim. Characterise the genes encoding the resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from residents of the Republic of Guinea.

Materials and Methods. 53 strains of *E. coli* were selected for an in-depth study of molecular mechanism of resistance. Total DNA were isolated from bacterial strains using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen). Whole genome sequencing was performed using MiSeq sequencing platforms (Illumina, USA) and DNBSEQ-G50 (MGI, China). Genomes were assembled de novo using SPAdes assembler software (v. 3.13.1). The build results were evaluated in QUAST (v. 5.2.0). The search for genetic factors of AMD resistance was carried out in ResFinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>).

Results. Genome analysis showed the genes for resistance to β -lactams, tetracycline, chloramphenicol, aminoglycosides, trimethoprim/sulfamethoxazole and single nucleotide substitutions and mutations in the genes *gyrA*, *parC* and *parE* that cause resistance to quinolones and fluoroquinolones (Table).

TABLE. GENETIC DETERMINANTS FOR RESISTANCE TO ANTIBIOTICS OF DIARRHEAGENIC *E. COLI* STRAINS IN THE REPUBLIC OF GUINEA

Antimicrobial agent	Determinants for resistance	
	gene	n
β -lactams (ampicillin III-IV generation cephalosporins)	<i>bla</i> _{TEM-1}	48
	<i>bla</i> _{OXA-1}	3
	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	7
	<i>bla</i> _{CTX-M-27}	7
	<i>bla</i> _{CTX-M-42}	1
Nalidixic acid	* <i>gyrA p. S83A</i>	1
	* <i>gyrA p. S83L</i>	16
	* <i>parE p. I529L</i>	7
Ciprofloxacin	* <i>gyrA p. D87N</i>	1
	* <i>parC p. S57T</i>	1
	* <i>parC p. S80T</i>	1
	* <i>parE p. S458A</i>	1
Aminoglycosides (gentamicin, tobramycin)	<i>aac(3)-IId</i>	8
Tetracycline	<i>tetA</i>	21
	<i>tetB</i>	12
	<i>tetD</i>	5
Chloramphenicol	<i>catA</i>	2

Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	<i>dfrA</i>	38
	<i>sul1</i>	11
	<i>sul2</i>	33

* – gene mutations/substitutions

The resistance of *E. coli* strains to ampicillin and cephalosporins was due to the production of β -lactamases of the genetic families TEM-1, OXA-1 and CTX-M encoded by the genes *bla*TEM-1, *bla*OXA-1, *bla*CTX-M-15, *bla*CTX-M-27, and *bla*CTX-M-42. Genes of resistance to β -lactam preparations were identified in combinations and isolated (*bla*TEM-1 + *bla*OXA-1; *bla*TEM-1 + *bla*CTX-M-15; *bla*TEM-1 + *bla*CTX-M-27; *bla*CTX-M-42 + *bla*CTX-M-15). In strains resistant to the quinolones/fluoroquinolones, chromosomal mutations and single nucleotide substitutions were found in the genes *gyrA*, *parC*, *parE*, whereas the plasmid-mediated gene *qnrS1* was not found. Five strains that were phenotypically susceptible to nalidixic acid revealed the gene *qnrS1* which determines low-level resistance to quinolones. In all cases, resistance to aminoglycosides (gentamicin and tobramycin) was mediated by the synthesis of bifunctional enzyme AAC(3') encoded by the gene *aac(3)-IId*. Resistance to tetracycline was due to the

production of efflux genes encoded by *tetA*, *tetB*, *tetD*. Resistance of strains to the combined drug trimethoprim/sulfamethoxazole was due to the presence of genes for resistance to trimethoprim (*dfrA*) and sulfamethoxazole (*sul1* and/or *sul2*).

Conclusion. The analysis of genetic determinants revealed 22 genotypes, which indicates a high heterogeneity of the resistance phenotypes of *E. coli* strains sampled from residents of the Republic of Guinea with diarrheal diseases. Our study using whole genome sequencing methods showed that antimicrobial resistance in the *E. coli* population has reached a significant level in the Republic of Guinea. 98% of the strains under study were characterised by a resistance spectrum ranging from 1 (ampicillin) to 9 different antibiotics (ampicillin and III-IV generation cephalosporins, quinolones and fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracyclines, trimethoprim/sulfamethoxazole, chloramphenicol), widely used in various countries of the world.

ТАРГЕТНОЕ ДНК-СЕКВЕНИРОВАНИЕ РЕДКИХ ВИДОВ ASPERGILLUS SPP

Хабибуллин Н.Р., Мальчикова А.О., Хрульнова С.А., Коваль Н.О., Ликольд Е.Б., Клясова Г.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, г. Москва

Актуальность. Инвазивный аспергиллез легких (ИАЛ) относится к тяжелым инфекционным осложнениям. Частота ИАЛ в гематологии достигает 12% — 14%. Основными возбудителями ИАЛ являются *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* и *A. niger*, однако, за последние годы возросла частота выделения редких видов *Aspergillus spp.*, идентификация которых на основании морфологии бывает затруднительной. Особую осторожность вызывают *Aspergillus spp.* с природной устойчивостью к противогрибковым препаратам. Так, природной резистентностью к амфотерицину В обладают *A. nidulans*, *A. terreus* и *A. alliaceus*, а к вориконазолу — *A. lentulus* и *A. calidoustus*.

Цель исследования. Провести с помощью таргетного ДНК-секвенирования верификацию до вида штаммов *Aspergillus spp.*, которые на основании морфологических характеристик были отнесены к категории штаммов с природной резистентностью к противогрибковым препаратам.

Материалы и методы. В исследование были включены штаммы *Aspergillus spp.*, выделенные из жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) от больных ФГБУ «НМИЦ гематологии» с ИАЛ и гематологическими заболеваниями (2000-2022 гг.). Все случаи ИАЛ были микологически подтвержденными и относились к категориям «доказанный» и «вероятный» (критерии EORTC/MSG, 2020 г.). Культуру *Aspergillus spp.* получали на среде Чапека или Сабуро с декстрозой. Идентификацию *Aspergillus spp.* проводили на основании морфологии (de Hoog G.S. et al., 2021). Дополни-

тельно проводили идентификацию методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS, MBT Filamentous Fungi Library 2.0, Bruker). Верификацию *Aspergillus spp.* до вида осуществляли на основании таргетного ДНК секвенирования фрагментов генов внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS), β -тубулина, кальмодулина и актина. Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программного обеспечения Vector NTI Advance. Филогенетический анализ проводили в программе MEGA-X.

Основные результаты. Было проведено исследование 8 *Aspergillus spp.* (*A. nidulans*, n=3, *A. terreus*, n=3, и *A. alliaceus*, n=2), которые по результатам морфологической идентификации были отнесены к категории штаммов с природной резистентностью к амфотерицину В. В таблице представлены результаты идентификации на основании морфологии, масс-спектрометрии и таргетного ДНК-секвенирования. Несоответствие между морфологической идентификацией и секвенированием наблюдалось по 5 (62,5%) из 8 *Aspergillus spp.*, между результатами масс-спектрометрии и таргетным ДНК секвенированием — по 3 (37,5%) из 8 штаммов. Всеми использованными методами была подтверждена только видовая принадлежность *A. nidulans* (n=3). Все штаммы, исходно идентифицированные как *A. terreus* (n=3) и *A. alliaceus* (n=2), имели другую видовую принадлежность по данным таргетного ДНК-секвенирования. При сравнении MALDI-TOF MS с таргетным ДНК-секвениро-

ванием было совпадение по 2 штаммам (*A. tamarii*, $n=2$). *A. micronesiensis* и *A. chevalieri* не удалось идентифицировать с помощью масс-спектрометрии.

Заключение. Отмечено совпадение результатов идентификации *A. nidulans* между всеми использованными методами. По другим редким исследованным видам *Aspergillus spp.* наблюдались несоответствия как по мор-

фологической идентификации, так и идентификации с помощью масс-спектрометрии и таргетного ДНК секвенирования. Для идентификации редких видов *Aspergillus spp.* с природной резистентностью к противогрибковым препаратам необходимо использовать таргетное ДНК-секвенирование, и, безусловно, есть необходимость в расширении библиотеки масс-спектро-профилей *Aspergillus spp.*

ТАБЛ. 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ *ASPERGILLUS SPP.* С ПРИРОДНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К АНТИМИКОТИКАМ

№ штамма	Морфологическая идентификация	Идентификация с помощью MALDI-TOF MS	Таргетное ДНКсеквенирование
1	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>
2	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>
3	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>
5	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. citrinoterreus</i>
4	<i>A. terreus</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>
6	<i>A. terreus</i>	Не идентифицирован	<i>A. micronesiensis</i>
7	<i>A. alliaceus</i>	Не идентифицирован	<i>A. chevalieri</i>
8	<i>A. alliaceus</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУЛЕНТНЫХ ПЛАЗМИД, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Нурмуканова В.А., Шаповалова В.В., Мацвай А.Д., Шипулин Г.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Введение. С каждым годом *Klebsiella pneumoniae* (*Kpn*) признается все более важным внутрибольничным патогеном, представляющим угрозу в том числе для иммунокомпетентных пациентов. Спектр клинических состояний при инфекции *Kpn* варьирует и может проявляться пневмонией, менингитом, инфекцией кровотока и др. В настоящее время в стационарах циркулируют два патотипа: классический — «сКр» и гипервирулентный — «hνКр», последний связан с повышенной патогенностью и летальностью в случае инфекции. Смене фенотипа на гипервирулентный, способствует в том числе приобретение плазмид, несущих гены факторов вирулентности. Однако, только треть генов, кодируемых этими плазмидами, имеют известную функцию. В 2018 году был впервые описан конвергентный фенотип *Kpn*, проявляющий одновременно признаки множественной лекарственной устойчивости и гипервирулентности. Инфекции, вызванные hνКр, часто диагностируются на основании клинической картины, поскольку не существует согласованного фенотипического теста на гипервирулентность, но было показано, что маркеры, присутствующие на плазмидах вирулентности, могут быть дополнительным фактором для дифференциации штаммов hνКр и сКр.

Цель исследования. Определить распространенность различных генов репликонов плазмид, несущих кластер генов фактора гипервирулентности аэробактерии, из комплекса *Klebsiella pneumoniae*, представленных в общедоступных базах данных последовательностей. Определить распространенность других факторов гипервирулентности и генов резистентности на исследуемых плазмидах.

Материалы и методы. Последовательности плазмид с геном аэробактерии А были выгружены из баз данных PLSDb v.2021_06_23_v2 и BV-BRC 3.30.5. Была проведена фильтрация хромосомных и неполных плазмидных последовательностей; включены последовательности только из изолятов комплекса *Klebsiella spp.* Репликоны плазмид вирулентности, факторы вирулентности, гены устойчивости к антибиотикам были идентифицированы с помощью Abricate и Kleborate с базами данных PlasmidFinder, Resfinder, при минимальном покрытии 60% и минимальной идентичности 90%.

Результаты. Всего было проанализировано 296 последовательностей плазмид, на которых гены репликонов группы IncFIB были выявлены почти во всех последовательностях (96,3%) в эту группу входили гены: repB_KLEB_VIR

(n=192), IncFIB(pNDM-Mar) (n=43), IncFIB(K) (n=4), IncFIB(AP001918) (n=3), IncFIB(pKPHS1) (n=2), IncFIB(K)(pCAV1099-114) (n=2), IncFIB(pQil) (n=2). Другими распространенными репликонами были IncHI1B (72,3%), а также IncFII (11,5%); минорная группа была представлена IncFIA, IncQ1, IncR, IncFIC (от 4% до 0,7%). Большинство плазмид (78,7%) несли два репликона, тогда как комбинация репликонов IncHI1B(pNDM-MAR) и repB_KLEB_VIR была идентифицирована более чем в половине проанализированных плазмид. Более 30 плазмид несли мультирепликон IncHI1B(pNDM-MAR)/IncFIB(pNDM-Mar), наиболее распространенными типами одиночных репликонов были repB_KLEB_VIR и IncFIB(K). Гены синтеза сальмохелина были выявлены только в 37,1% исследуемых образцов. Проведено сравнение наличия этих факторов гипервирулентности в зависимости от типов репликонов на плазмиде: 88,9% плазмид с одним репликоном repB_KLEB_VIR несли полный *iro*-кластер, тогда как только 1 плазмиды с мультирепликоном IncHI1B(pNDM-MAR)/IncFIB(pNDM-Mar) и 1 плазмиды с репликоном IncFIB(K) несли этот кластер в полном составе генов. Было замечено, что исследуемые плазмиды вирулентности также несли локусы мукоидного фенотипа *rmpADC* (62,2%) и *rmpA2* (82,1%). Носительство гена транспортера

peg-344 составляло не более 40% в плаزمидах всех типов репликонов. 88,2% плазмид с мультирепликоном IncHI1B(pNDM-MAR)/IncFIB(pNDM-Mar) несли гены устойчивости к антибиотикам, тогда как только 6% плазмид с мультирепликоном IncHI1B(pNDM-MAR)/repB_KLEB_VIR были гибридными, то есть несущими сочетание генов гипервирулентности и резистентности.

Заключение. Были исследованы генетические особенности плазмид, несущих факторы гипервирулентности и выделенные из представителей комплекса *Kpn*. Плазмиды несли одиночные и множественные репликоны; варианты репликона IncFIB (конъюгативной плазмиды, которая ассоциирована в том числе с распространением вариантов гена *bla*), присутствовали почти в каждой из отобранных плазмид. Плазмиды с репликоном repB_KLEB_VIR (как одиночным, так и мультирепликонным), выявленным в большинстве плазмид с репликоном из группы IncFIB, чаще других плазмид несли кластер генов сальмохелина (*iroBCDN*) в качестве дополнительного маркера гипервирулентности, локус гипермукоидного фенотипа *rmpADC* и ген регулятора капсульного полисахарида *rmpA2*. Почти треть плазмид вирулентности были гибридными, кодирующими гены устойчивости к антибиотикам.

ПЕРВОЕ В РОССИИ СООБЩЕНИЕ О МУТАЦИИ В ГЕНЕ FKS У ЭХИНОКАНДИН РЕЗИСТЕНТНОГО ШТАММА *CANDIDA GLABRATA*, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ГЕМОКУЛЬТУРЫ: РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЦЕНТРОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Хабибуллин Н.Р.¹, Мальчикова А.О.¹, Хрульнова С.А.¹, Ликольд Е.Б.¹, Ветохина А.В.², Клясова Г.А.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, г. Москва

² ГБУЗ «Иркутская ордена «Знак Почета» областная клиническая больница», г. Иркутск

Актуальность. *Candida glabrata* входит в число ведущих возбудителей инвазивного кандидоза. Препаратами выбора в лечении инвазивного кандидоза, вызванного *C. glabrata*, являются эхинокандины. Отсутствие эффекта от терапии эхинокандинами может быть обусловлено мутациями в высококонсервативных «hot spot» участках генов FKS.

Цель исследования. Выявить мутационные изменения в «hot spot» участках генов FKS среди *C. glabrata*, выделенных из гемокультуры и других стерильных в норме образцов.

Материалы и методы. Проведено изучение штаммов *C. glabrata*, выделенных из стерильных в норме образцов от больных с инвазивным кандидозом в рамках многоцентрового проспективного исследования (2005-2022 гг.). Все штаммы были идентифицированы методом матрично-активированной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI TOF MS) на анализаторе Microflex (Bruker Daltonics, Германия) в отделе микробиологии и антимикробной терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ. Чувствительность к эхинокандинам исследовали методом серийных микроразведений в бульоне RPMI-1640 (Sigma Aldrich, США) согласно рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, M27M44S, 2022 г.). Категории чувствительности *C. glabrata* к аниду-

лафунгину и каспофунгину определяли на основании пограничных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК), CLSI, M27M44S, 2022 г. Штаммы оценивали как «чувствительные» при значениях МПК $\leq 0,12$ мкг/мл, «умеренно-резистентные» — при МПК 0,25 мкг/мл и «резистентные» — при МПК $\geq 0,5$ мкг/мл. Для контроля использовали *C. parapsilosis* ATCC22019 и *C. albicans* ATCC90028. Методом ПЦР (методика Dudiuk et al.1) у всех штаммов *C. glabrata* исследовали наиболее распространенные мутации в высококонсервативном «hot spot» 1 участке гена *FKS1* (мутации F625S, S629P, D632E/G/Y) и гена *FKS2* (мутации F659S/V/Y, S663F/P). Секвенирование по Сэнгеру «hot spot» 1 и «hot spot» 2 участков генов *FKS* проводили среди эхинокандин-резистентных штаммов. Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программного обеспечения Vector NTI Advance.

Основные результаты. Всего в исследование было включено 55 *C. glabrata*. Резистентность к анидулафунгину и каспофунгину была определена у 3 (5,5%) штаммов, значения МПК которых варьировали от 0,5 мкг/мл до >8 мкг/мл (табл.). В одном из трех эхинокандин-устойчивых изолятов была обнаружена замена S663P в «hot spot» 1 гена *FKS2*. Значение МПК каспофунгина у штамма с мутацией S663P в гене *FKS2* было наиболее высоким и составило >8

мкг/мл. Штамм *C. glabrata* с заменой S663P в гене FKS2 был выделен из крови от больной с панкреонекрозом без гематологического заболевания, находившейся в отделении реанимации и интенсивной терапии.

Заключение. Впервые в России нами был обнаружен штамм *C. glabrata* с мутацией S663P в гене FKS2. Изолят характеризовался устойчивостью к эхинокандинам и имел экстремально высокое значение МПК каспофунгина (>8 мкг/мл).

ТАБЛ. С. GLABRATA, УСТОЙЧИВЫЕ К ЭХИНОКАНДИНАМ

№ штамма	Образец	Отделение	Дата выделения	Значения МПК (мкг/мл)		Мутации в FKS1		Мутации в FKS2	
				Анидулафунгин	Каспофунгин	HS1	HS2	HS1	HS2
1	Кровь	ОРИТ	06.03.2019	1	>8	нет	нет	S663P	нет
2	Кровь	ОРИТ	10.06.2013	1	0,5	нет	нет	нет	нет
3	Кровь	ОРИТ	12.06.2013	0,5	0,5	нет	нет	нет	нет

Примечание: HS — «hot spot»

1. Dudiuk C, Gamarra S, Leonardeli F, et al. Set of classical PCRs for detection of mutations in *Candida glabrata* FKS

genes linked with echinocandin resistance. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2609-2614. doi:10.1128/JCM.01038-14

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗИСТОМА ШТАММОВ *ACINETOBACTER BAUMANNII*, УСТОЙЧИВЫХ К КАРБАПЕНЕМАМ

Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Махова М.А., Черневская О.М., Барышева Н.Н.

ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Введение. Полирезистентные штаммы *Acinetobacter baumannii* относятся к группе наиболее проблемных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в системе глобального здравоохранения. Штаммы *A. baumannii* характеризуются природной устойчивостью к значительному числу антибактериальных препаратов различных классов, обусловленная, как участием эффлюкс-систем различных типов (ABC, MATE, RND, MFS, SMR), так и хромосомных генов бета-лактамаз, аминогликозидаз, тетрациклинах, хинолонов. Немаловажным механизмом является мутационная изменчивость генов, кодирующих мишени действия антибиотика (гены *surA*, *parC*). Однако, наиболее опасными являются штаммы с приобретенной резистентностью к карбапенемам, ингибиторам бета-лактамаз, колистину, тигециклину. Распространение таких штаммов обуславливает необходимость постоянного мониторинга формирования, в первую очередь, с участием мобильных элементов, новых генетических механизмов устойчивости полирезистентных штаммов *A. baumannii*.

Цель работы — определение структуры резистома карбапенем-устойчивых штаммов *A. baumannii*, выделенных из мокроты и раневой поверхности пациентов, находящихся на стационарном лечении в медицинских организациях г. Нижнего Новгорода, на основе биоинформатического анализа данных полногеномного секвенирования.

Материалы и методы исследования. ДНК чистых культур *A. baumannii* выделяли с помощью коммерческого набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ЦНИИЭ, Россия). Полногеномное секвенирование ДНК проводили на секвенаторе GenoLab M (GeneMind Biosciences Co., Китай), с использованием набора Shotgun GM kit (Sesana, Россия) для подго-

товки библиотеки. Сборку чтений de novo осуществляли с помощью программного обеспечения SPAdes версия 3.9.1. Для типирования штаммов использовали базу данных *Acinetobacter baumannii* MLST Databases (<https://pubmlst.org/abaumannii/>), а для поиска детерминант антибиотикорезистентности — базу данных The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (<https://card.mcmaster.ca/>). Определение нуклеотидных последовательностей, принадлежащих плазмидам проводили с использованием сервиса BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Детекцию генов антибиотикорезистентности, ассоциированных с мобильными элементами, определяли с помощью сервиса VRprofile2 (<https://tool2-mml.sjtu.edu.cn/VRprofile/home.php>).

Результаты и обсуждение. В результате биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей геномов исследуемых штаммов *A. baumannii* были определены их генотипы, детерминанты резистентности, выявлены последовательности плазмид (таблица 1). Установлено, что 4 штамма *A. baumannii* относятся к сиквенс-типу (ST) 2/2062, 2063 (схема Pasteur/Oxford, соответственно), входящего в состав глобально распространенного клонального комплекса 2 (CC2). Один штамм относится к ST 78/1757 (схема Pasteur/Oxford, соответственно) и клональному комплексу CC6.

Сравнительный анализ резистома показал, что все штаммы *A. baumannii* ST^{Pas}2/ST^{Oxf} 2062, 2063 обладают одинаковым набором детерминант резистентности, которые локализованы в хромосомной ДНК. В геноме присутствуют гены бета-лактамазы *bla*_{ADC-30} и карбапенемаз *bla*_{OXA-66}, *bla*_{OXA-23}. В результате анализа в структуре генома обнаружен широкий спектр детерминант устойчивости к аминогликозидам, вклю-

чающий гены шести аминогликозидаз и ген 16S рРНК метилазы. В составе интегрона 1-го класса выявлены гены устойчивости к рифампицину (*arr-2*) и хлорамфениколу (*cmIA5*), а гены устойчивости к макролидам (*mphE*, *msrE*) и аминогликозидам (*armA*) ассоциированы с мобильным элементом ISEc29. Отмечено, что у всех четырех штаммов данного генотипа об-

наружены последовательности, принадлежащие плазмидной ДНК, размером 11-14 тыс.п.н. Согласно схеме типирования плазмид *A. baumannii*, предложенной Bertini et al. (2010), данные плазмиды относятся к типу GR8. У штамма NNAb_23.4 выявлено присутствие еще одной плазмиды генотипа GR6. Гены резистентности в структуре всех плазмид отсутствуют.

ТАБЛИЦА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ШТАММОВ ACINETOBACTER BAUMANNII

Показатели	NNAb_23.1	NNAb_23.2	NNAb_23.3	NNAb_23.4	NNAb_23.5
Размер генома, Гб	3,93	4,01	4,04	4,08	4,02
Плазмиды	11 тыс.п.н.	11 тыс.п.н.	15 тыс.п.н.	14 тыс.п.н. 62,5 тыс.п.н.	11 тыс.п.н.
ST ^{Pas}	2	2	78	2	2
ST ^{Oxf}	2062, 2063	2062, 2063	1757	2062, 2063	2062, 2063
Детерминанты антибиотикорезистентности	<i>bla</i> _{ADC-30r} , <i>bla</i> _{OXA-66r} , <i>bla</i> _{OXA-23r} , <i>ant</i> (3'')-II, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib9, <i>aadA</i> , <i>sul2</i> , <i>armA</i> , <i>msrE</i> , <i>mphE</i> , <i>catB8</i> , <i>cmIA5</i> , <i>arr-2</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>bla</i> _{ADC-30r} , <i>bla</i> _{OXA-66r} , <i>bla</i> _{OXA-23} <i>ant</i> (3'')-II, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib9, <i>aadA</i> , <i>sul2</i> , <i>armA</i> , <i>msrE</i> , <i>mphE</i> , <i>catB8</i> , <i>cmIA5</i> , <i>arr-2</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>bla</i> _{ADC-152r} , <i>bla</i> _{CTX-M-115r} , <i>bla</i> _{CARB-16r} , <i>bla</i> _{OXA-90r} , <i>bla</i> _{OXA-72r} , <i>ant</i> (3'')-II, <i>aac</i> (6')-Ia, <i>aph</i> (3'')-Ia, <i>aadA5</i> , <i>sul1</i> , <i>mphE</i> , <i>msrE</i> , <i>armA</i> , <i>floR</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>bla</i> _{ADC-30r} , <i>bla</i> _{OXA-66r} , <i>bla</i> _{OXA-23r} , <i>ant</i> (3'')-II, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib9, <i>aadA</i> , <i>sul2</i> , <i>armA</i> , <i>msrE</i> , <i>mphE</i> , <i>catB8</i> , <i>cmIA5</i> , <i>arr-2</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>bla</i> _{ADC-30r} , <i>bla</i> _{OXA-66r} , <i>bla</i> _{OXA-23r} , <i>ant</i> (3'')-II, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib9, <i>aadA</i> , <i>sul2</i> , <i>armA</i> , <i>msrE</i> , <i>mphE</i> , <i>catB8</i> , <i>cmIA5</i> , <i>arr-2</i> , <i>qacEdelta1</i>
Мутации в хромосомных генах	<i>gyrA</i> (S81L), <i>parC</i> (S84L, V104I, D105E)				

Штамм *A. baumannii* NNAb_23.3, принадлежащий STPas78/STOxf1757, характеризуется наличием генов бета-лактамаз широкого (*bla*_{ADC-152r}, *bla*_{CARB-16r}) и расширенного спектра (*bla*_{CTX-M-115r}), а также карбапенемаз (*bla*_{OXA-90r}, *bla*_{OXA-72r}). Установлено, что ген *bla*_{OXA-72r} находится в составе плазмидной ДНК размером 15 тыс.п.н., определить генотип которой по схеме Bertini et al. не удалось. В структуре генома данного штамма присутствуют также гены устойчивости к аминогликозидам и макролидам, причем гены *mphE*, *msrE*, *armA*, *sul1*, *qacE* и *aadA5* сгруппированы вместе и ассоци-

ированы с мобильным элементом ISEc29 и IS91-подобным элементом семейства транспозаз ISCR1.

Выводы. Таким образом, резистом всех исследуемых штаммов *A. baumannii* характеризуется наличием широкого разнообразия детерминант резистентности, большинство из которых ассоциированы с мобильными элементами, что свидетельствует о высокой пластичности генома штаммов *A. baumannii* и их способности быстро эволюционировать за счет приобретения новых генов.

СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗИСТОМА И ВИРУЛОМА ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI* ОТ ХРОНИЧЕСКИ ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ 2-Х НОЗОЛОГИЙ: МУКОВИСЦИДОЗ И ЦИСТИТ. НОВЫЙ ПОДХОД К ЭРАДИКАЦИИ ИНФЕКЦИИ

Воронина О.Л.¹, Кунда М.С.¹, Аксенова Е.И.¹, Рыжова Н.Н.¹, Королева Е.А.¹, Соловьева А.В.¹, Бурмистров Е.М.¹, Амелина Е.Л.², Чернуха М.Ю.¹, Зигангирова Н.А.¹

¹ ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУ НИИ Пульмонологии ФМБА России, Москва, Россия

Введение. *Escherichia coli*, как комменсал, является составной частью кишечной микробиоты человека, однако патогенные *E. coli* вызывают как кишечные, так и внекишечные (экстраинтестинальные) эшерихиозы. Последние получили название ExPEC. Инфекции мочеполового, респираторно-

го трактов, неонатальные менингиты — настолько широк спектр действия ExPEC. Инфицирование мочеполового и респираторного трактов ExPEC, произошедшее в детстве, часто приводит к хронизации инфекции, поскольку большой набор факторов патогенности, а также множественная,

и даже широкая резистентность ExPEC не позволяют эффективно бороться с инфекцией известными антимикробными препаратами. Мы сравнили 2 случая носительства ExPEC, длившихся десятилетиями: уропатогенной *E. coli* (UPEC) при цистите и респираторной (RPEC) при муковисцидозе. И опробовали новый подход к эрадикации ExPEC с помощью инновационного антибактериального препарата Фтортиазинон, разработанного в Центре Н.Ф. Гамалеи.

Материалы и методы. Изоляты *E. coli* выделили от пациента с циститом — UPEC GIMC1401:EC_CNL19, и от пациента с муковисцидозом — RPEC GIMC1402:EC_33P15. Полногеномное секвенирование с последующим биоинформационным анализом дополнили исследованием *in vitro* подвижности, биопленкообразования и влияния на эти процессы Фтортиазинона. Инфекцию мочевыводящих путей моделировали на крысах, выполняя уретральное заражение животных изолятом UPEC.

Результаты. Изоляты UPEC и RPEC отличались прежде всего фенотипическими свойствами. Гипермукоидность и малая подвижность RPEC подтвердили характеристики *E. coli* при хронизации инфекции у пациентов с муковисцидозом. Геномы бактерий зарегистрировали в GenBank (PRJNA561493), их размер составил 5470399 и 5489187 bp для RPEC и UPEC, соответственно, что превышает размер комменсалов на 1 Mb. Согласно схеме Achtman MLST, генотип RPEC — ST648, UPEC — ST69. ExPEC ST648 распространен на всех континентах, ST69 — отсутствует в Африке, но в целом по частоте встречаемости находится на 2 месте после ST131 (Manges, 2019). Резистом обоих изолятов достаточно обширен, но есть некоторые различия. В категории аминогликозидов RPEC имеет гены устойчивости к гентамицину и сизомицину, а UPEC — к стрептомицину. Устойчивость к фениколам и макролидам характерна для RPEC. Beta-лактамаза класса A TEM присутствует у двух изолятов, у RPEC есть дополнительный CTX-M фермент этого класса. Лактамазы класса C представлены BlaEC. В классе D OXA-1 характерна для RPEC и OXA-10 – для UPEC. У обоих изолятов есть оперон *MagABR*, обеспечивающий множественную устойчивость, в том числе к ципрофлоксацину и тетрациклину. 26 эффлюксных помп присутствует у UPEC и 28 у RPEC. *MexAB-OprM*

оперон есть только у RPEC. Поиск ориджинов репликации плазмид показал, что RPEC отличает наличие фагоплазмиды, подобной H89-PhagePlasmid, которая и привносит дополнительные гены устойчивости.

Из факторов патогенности базовые связаны с системами секреции III типа (T3SS), флагеллами и пилиями. У ExPEC отсутствует T3SS LEE (locus of enterocyte effacement), характерная для энтеропатогенных *E. coli*, но есть T3SS2, представленная всеми 35 рамками считывания, как у UPEC, так и у RPEC. ATФазе T3SS2 отводится особая роль в патогенезе *E. coli*, поскольку активность фермента обеспечивает работу флагелл и фимбрий, а также подавление воспалительных цитокинов: интерлейкинов (IL)-1b and IL-8, в инфицированных *E. coli* макрофагах (Wang, 2016). Из 16 локусов фимбрий, выявленных в референсном геноме O157:H7 str. Sakai, 12 присутствуют в геноме UPEC и 10 — в RPEC. Локусы 4 и 14, формирующие пили I типа, отсутствуют у RPEC по сравнению с UPEC. Из оперонов, отвечающих за поглощение железа, все, в том числе сайдерофоры, представлены в обоих геномах.

В экспериментах *in vitro* Фтортиазинон подавлял образование биопленок, как у UPEC, так и у RPEC, а также подвижность UPEC. При моделировании инфекции мочевыводящих путей на крысах при уретральном заражении изолятом UPEC Фтортиазинон приводил к эрадикации патогена из тканей мочевого пузыря и предстательной железы.

Кроме того, терапевтическое действие Фтортиазинона было показано в клинических исследованиях на пациентах с осложненными инфекциями мочевыводящих путей. Исследования продемонстрировали превосходство комбинированной терапии Фтортиазинон с Цефепимом перед терапией только Цефепимом на 25 % по общему ответу и на 13% по микробиологической эрадикации.

Таким образом, инновационный препарат Фтортиазинон может способствовать эрадикации ExPEC с множественной лекарственной устойчивостью даже в случаях хронической инфекции.

Работа финансируется Государственным заданием ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России ч.2. раздел 1, направление 3.3.9. (номер реестровой записи 720000Ф.99.1.БН62АБ47000)

РАЗРАБОТКА ПЦР СИСТЕМ ДЛЯ БЫСТРОГО СКРИНИНГА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Корниенко М.А., Беспярых Д.А., Малахова М.В., Городничев Р.Б., Шитиков Е.А.

ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

Появление и распространение бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) — одна из главных угроз общественному здоровью в XXI веке. Перспективным вариантом терапии инфекций, вызванных штаммами с МЛУ, является использование природных антагонистов бактерий — (бактерио)фагов. Надо отметить, что для терапии инфекций допустимо использование исключительно вирулентных бактериофагов, т.е. бактерио-

офагов, реализующих литический жизненный цикл. Цель исследования заключалась в разработке схемы первичного скрининга фагов *S. aureus* и *K. pneumoniae*, потенциально пригодных для терапии.

Материалы и методы. Геномы фагов (n = 749) получены из базы NCBI RefSeq/GenBank. Аннотирование генов проводили с помощью Prokka. Таксономическое положение фагов определяли на основании ICTV Master Species

List 2021 и с использованием vConTACT2. Тип взаимодействия фага с клеткой предсказан с помощью VACPHLIP. Анализ ортологичных генов проводили с помощью PIRATE, далее рассматривали гены с идентичностью >60% и средней длиной >400 п.н. ПЦР праймеры подбирали с помощью OLIGO. Валидацию праймеров проводили на коллекции фагов (стафилофаги (n = 6); фаги клебсиелл (n = 15)).

Результаты. Для разработки схемы типирования предложен поиск таксон-специфических семейств ортологичных генов на выборке фаговых геномов. В результате анализа подобраны пары праймеров, способные идентифицировать два семейства вирулентных стафилофагов (*Herelleviridae*: f-GAATTAACCTTCTGGTGGGG r-ATACTTTTCATCATAMGGTAA и *Rountreeviridae*: f-TCAATTTCCAAACATTAGCAG r-GGATTTACATCTTGGTCAGTA) и 11 родов вирулентных фагов клебсиелл (*Przondovirus*: f-CGTACAACCAAGGKGAAGG r-TCCGTGAACACATCRTACCC, *Taipeivirus*: f-AGTTCTGAACACCAAGGC r-CCAACCTCAGAGCCGTTCC, *Druilisvirus*: f-CGCTCCGTAACGATAAGATG r-ACGCAGACCGATGTTGTAC, *Webervirus*: f-CCTATGATGACGACTCAAAC r-ATTGCCAGCCATCTTATCAG, *Jiaodavirus*: f-TGAACATCAAAGCAATTCGTG r-AACCACAGAATGCCAGAATC, *Sugarlandvirus*: f-GATCTACCAAGCTGTCCAG r-AGTCGTTGTTACTCGTCC, *Slopekvirus*: f-TCAAAGAACAATACGAAGAGG

r-TTGCCATTGCTTCCAGAGAG, *Jedunavirus*: f-ACTTCTATTGTCATGGCTGG r-CACCTTACAGTTTAGCGTC, *Marfavirus*: f-GCACCTGAAGGCATTACCC r-CCCATCAATAGAATAAAGCAC, *Mydovirus*: f-GATCGAAAAGAATGTCTGGG r-TTGGTCTACGATAATATCAGG и *Yonseivirus*: f-GCACGCCGACCTATCCCG r-GCCACGGTCATTGATAAGC).

Чувствительность выбранных пар праймеров соответствует концентрации ДНК фага в диапазоне от 150 до 1,5 пг/мкл. Специфичность праймеров проверена на бактериофагах, относящихся к нецелевым таксономическим единицам (n = 21), а также на бактериальных штаммах *S. aureus* и *K. pneumoniae* (n = 30). Выбранные праймеры позволяют обнаружить все известные в настоящее время вирулентные фаги *S. aureus*. В случае фагов *K. pneumoniae* предложенная схема способна дифференцировать вирулентных бактериофагов, относящихся к 11 родам, характеризующим большинство известных на сегодняшний день вирулентных фагов *K. pneumoniae* (92,4%).

Заключение. Описанная схема облегчит отбор фагов для дальнейшего изучения и их применение в терапевтических целях.

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

АКТИВАЦИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ОРГАНИЗМА КАК АЛЬТЕРНАТИВА АНТИБИОТИКАМ В БОРЬБЕ С РЕЗИСТЕНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ. УСИЛЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЛИЗОЦИМА В ПРИСУТСТВИИ СВОБОДНЫХ ЗАРЯЖЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ

Левашов П.А., Смирнов С.А., Растрига Н.В.

ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (МГУ), Москва, Россия

Введение. В последнее время всё больше обостряется проблема распространения патогенных бактерий, устойчивых к антибиотикам. Крайне актуальной стала разработка новых антибактериальных препаратов, альтернативных антибиотикам. Одной из альтернатив выступают бактериолитические ферменты, в частности куриный лизоцим, который широко применяется в медицине и биотехнологии [1, 2]. Кроме того собственный лизоцим человека — это важный фактор врождённого иммунитета, присутствующий в организме как в свободной форме, так и в составе лизосом фагоцитирующих иммунных клеток [3, 4]. Согласно исследованиям последних лет лизоцим функционирует не только как фермент, но и как иммунорегулятор [5], а также, вероятно, выступает в качестве опсонина, улучшающего распознавание патогенных бактерий иммунными клетками, что отчасти объясняется способностью лизоцима одновременно связываться и с бактериями и с иммуноглобулинами G [6, 7]. Отдельного внимания требует также неожиданно выявленная способность лизоцима связывать эндотоксины (липополисахариды) бактерий [7]. Сравнительно недавно было обнаружено ранее неизученное явление, что сво-

бодные заряженные аминокислоты и глицин могут существенно усиливать антибактериальное действие лизоцима по отношению к грамотрицательным бактериям [8, 9], при этом, например, свободные ароматические аминокислоты на активность лизоцима практически не влияют [8].

Цель и задачи. Данная работа является продолжением изучения активации лизоцима в присутствии различных сочетаний свободных аминокислот. Целью работы является поиск наилучших сочетаний смесей свободных аминокислот, которые могут существенно усиливать антибактериальное действие собственного лизоцима организма и лизоцима в составе лекарственных препаратов.

Материалы и методы. В работе использовали очищенный яичный куриный лизоцим и рекомбинантный человеческий лизоцим производства компании Sigma-Aldrich (США). В качестве субстрата лизоцима использовали клетки *Escherichia coli* (штамм: K-12, номер ВКПМ: В-3254). Бактериолитическую активность лизоцима определяли турбидиметрическим методом по скорости осветления суспензии бактерий при длине волны 650 нм при температуре 37 °С, используя двухлучевой спектрофотометр UV-1801 произ-

водства компании Shimadzu (Япония) [10]. Равновесные параметры адсорбции лизоцима на живых бактериальных клетках изучали в условиях проведения измерения активности (состав буфера, температура, концентрация бактерий) [11]. В исследовании проверяли параметры активности и адсорбции лизоцима в различных условиях. Различные комбинации свободных аминокислот (от одной до трёх одновременно) в растворе варьировали в пределах от 0 до 5 мМ для Gly, Asp, Glu, His, Arg, Lys. Значение pH изменялось от 7.0 (для плазмы крови принимаем значение 7.4) до 9.0 (8.5 — оптимум активности на клетках *Escherichia coli*). Значение ионной силы варьировалось от 10 мМ (моделирование состояния разбавленной слюны) до 150 мМ (модель плазмы крови).

Основные результаты. Было установлено, что наибольшая активация антибактериального действия куриного лизоцима наблюдается в присутствии смеси Lys+His+Arg, каждой аминокислоты по 5 мМ, наибольшая активация человеческого лизоцима наблюдается в присутствии смеси Glu+His+Arg каждой аминокислоты 5 мМ. Кратность усиления антибактериальной активности достигает 3-4 раз в физиологических условиях и до 9-10 раз в условиях раствора с низкой ионной силой. Все изученные в работе свободные аминокислоты в концентрации 5 мМ увеличивали константу связывания лизоцима на поверхности бактериальной клетки в 1.4-2.5 раза в зависимости от выбранной аминокислоты и от условий. Наилучший эффект улучшения сорбции лизоцима на поверхности бактериальной клетки демонстрировала добавка аргинина 5 мМ. Вероятно, мы имеем дело с усилением продуктивной сорбции фермента, которое сопровождается повышением антибактериальной активности. Кроме того, усиление сорбции лизоцима должно повышать его эффективность действия в качестве опсонина [6, 7].

Заключение. Возможность активации лизоцима в присутствии свободных аминокислот открывает принципиально новые варианты борьбы с антибиотикорезистентными бактериями. Например, определённая комбинация безопасных для организма свободных аминокислот, которые в настоящее время используются как биологически активные

добавки (БАДы), возможно, заметно улучшит функционирование собственной иммунной системы человека на уровне распознавания и нейтрализации бактерий фагоцитами. В сочетании с классическими методами лечения различных бактериальных инфекций, например, сепсиса подобные «пищевые добавки» потенциально могут увеличить шансы пациента на благоприятный прогноз. Также весьма перспективными видятся активирующие добавки в составе препаратов на основе куриного лизоцима, например, таблеток для рассасывания или растворов для полоскания ротовой полости при стоматите и ангине, противоожоговых повязок и т.д.

Работа выполнена в МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках государственного задания «Изучение резистентности бактерий к антибиотикам на основе получения рекомбинантных бета-лактамаз, определения их структуры и взаимодействия с субстратами и ингибиторами методами математического моделирования и ферментативной кинетики, разработки антибактериальных соединений и новых лекарственных форм, методов молекулярной диагностики антибиотикорезистентности бактерий и определения антибиотиков в объектах окружающей среды и продуктах питания для создания новых подходов эффективного преодоления резистентности». Номер ЦИТИС: 123032300028-0.

Литература

1. Israni N., et al. // J Gen Eng Biotech, 2018, 16, 265.
2. Ferraboschi P., et al. // Antibiotics 2021, 10(1534), 1.
3. Yuseff M.I., et al. // Immunity, 35, 361.
4. Hanstock H.G., et al. // Front. Immunol., 2019, 10(1178), 1.
5. Ragland S.A., et al. // PLoS Pathog, 2017, 13, e1006512.
6. Daniel M.P., et al. // Indian J Surg, 2015, 77, 117.
7. Levashov P.A., et al. // Biotechnol Rep, 2019, 24, e00381.
8. Левашов П.А., и др. // Acta Naturae, 2017, 9(2), 87.
9. Levashov P.A., et al. // FEBS Open Bio, 2019, 9(3), 510.
10. Levashov P.A., et al. // Analytical Chemistry, 2010, 82(5), 2161
11. Sedov S.A., et al. // Colloids Surf. B Biointerfaces, 2011, 88, 131.

РАЗРАБОТКА ТЕСТА НА ОСНОВЕ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК МЕТИЦИЛЛИН-РЕЗИСТЕНТНЫХ СТАФИЛОКОККОВ И ДНК *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Глуценко Е.Е., Данилова В.С., Савочкина Ю.А., Данилов Д.И., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Бактерии рода *Staphylococcus* являются одной из наиболее распространенных групп возбудителей госпитальных инфекций. В списке приоритетно-значимых антибиотикорезистентных бактерий, представленном ВОЗ, метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA) входит в группу высокого приоритета. Доля *S. aureus* в структуре бактериальных возбудителей нозокомиальных инфекций в РФ по результатам крупного многоцентрового исследования, проведенного в 2018–2019 гг., составляла 7,7%. Значимой для клинической практики

проблемой при стафилококковых инфекциях является широкое распространение метициллин-резистентных штаммов стафилококков, которые являются устойчивыми ко всем бета-лактамам антибиотикам, за исключением анти-MRSA цефемов. Для идентификации *Staphylococcus spp* и определения чувствительности к антибиотикам широко применяются традиционные микробиологические методы, однако они требуют длительного времени для получения результатов анализа. Выявление генетических детерминант метициллин-резистентных стафилококков

(гена *mecA*, а также редко встречающегося у клинических изолятов варианта — гена *mecC*) методом ПЦР или другими методами амплификации ДНК признано эффективным подходом для детекции MRSA. Существуют и успешно применяются в практике тесты на основе ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) нескольких российских производителей. Однако до настоящего времени не было предложено для выявления генетических маркеров MRSA на основе новых изотермических методов амплификации, которые могли бы позволить значительно сократить время проведения анализа, а также упростить его процедуру.

Целью данной работы было разработать тест для выявления ДНК метициллин-резистентных стафилококков и ДНК *S.aureus* на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP) и провести его первичную апробацию.

Материалы и методы. Для разработки нового молекулярного теста был выбран метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) с детекцией продуктов амплификации с помощью флуоресцентно-меченого праймера. Дизайн праймеров для генов-мишеней *nuc*, *mecA*, и гена 16S rRNA *Staphylococcus spp.* был произведен с использованием ПО PrimerExplorer V5 (Eiken Chemical Co., Ltd.).

Для проведения LAMP-реакции была выбрана температура 64°C в течение 50 циклов по 30 секунд. Реакцию LAMP с детекцией в режиме реального времени проводили на амплификаторах CFX96 (BioRad, США) или ДТ-прайм (ДНК-технология, Россия).

Для апробации разработанного теста проводилось тестирование панели бактериальных штаммов, обладающих и не обладающих целевыми генами, ранее охарактеризованных клинических изолятов различных видов стафилококков, 30 образцов цельной крови и 30 модельных положительных образцов крови и гемокультур. Результаты оценивали в сравнении с результатами тестирования с помощью зарегистрированного в качестве медицинского изделия набора реагентов для выявления ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* методом ПЦР в режиме реального времени «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия).

Выделение ДНК из образцов биоматериала после предварительной обработки проводили с использованием комплекта реагентов «АмплиТест® Рибо-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России). Для контроля этапов экстракции ДНК и реакции амплификации был использован экзогенный внутренний контроль (ВКО), представляющий собой искусственно синтезированную последовательность ДНК,

заклоченную в оболочку фага лямбда. Для контроля этапа LAMP были использованы положительные контрольные образцы (ПКО), представляющие собой фрагменты ДНК-мишени, клонированные в плазмидный вектор. Для определения аналитической чувствительности использовали ПКО, концентрация которых была измерена методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (BioRad, США).

Результаты. Разработанный тест для выявления ДНК метициллин-резистентных стафилококков и ДНК *S.aureus* на основе метода LAMP включает проведение двух реакций, в каждой из которых регистрируются 2 ДНК-мишени. В первой реакции происходит одновременная амплификация и детекция фрагмента гена-маркера метициллин-резистентных стафилококков *mecA* и ДНК экзогенного внутреннего контроля (ВКО). Во второй реакции происходит амплификация и детекция ДНК-маркера *Staphylococcus aureus* (фрагмента гена *nuc*) и ДНК *Staphylococcus spp* (фрагмента гена 16S рПНК). Для детекции используются мишень-специфичные флуоресцентно-меченые праймеры. Время проведения амплификации составляет около 35 минут.

Предел обнаружения теста составил 103 копий/мл для каждой из ДНК-мишеней. Результаты тестирования ДНК клинических изолятов *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* и *S.hominis*, обладающих геном *mecA* или не имеющих этого гена, с использованием разработанного LAMP-теста полностью совпадали с результатами тестирования с использованием зарегистрированного для применения в диагностике набора реагентов «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» на основе метода ПЦР-РВ. Получено полное соответствие результатов нового LAMP-теста и вышеуказанного ПЦР-набора и при тестировании образцов крови (включая нативные и модельные положительные образцы с содержанием ДНК-мишеней в диапазоне от 500 до 104 копий/мл) и гемокультур, содержащих ДНК *S. aureus* или стафилококков других видов, обладающих геном *mecA* или не имеющих этого гена, а также не содержащих ДНК стафилококков.

Выводы. Разработанный тест на основе петлевой изотермической амплификации LAMP позволяет выявлять ДНК метициллин-резистентных стафилококков и ДНК *Staphylococcus aureus* в образцах биологического материала. Применение метода петлевой изотермической амплификации LAMP для обнаружения названных возбудителей инфекции позволяет сократить полное время анализа до 1 часа, в самые краткие сроки предоставлять информацию важную для своевременного выбора или корректировки антибиотикотерапии.

Раздел 17. КАЧЕСТВО, БЕЗОПАСНОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

ОЦЕНКА ПОРОГОВЫХ КРИТЕРИЕВ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ, ДОСТАТОЧНЫХ ДЛЯ ОТКАЗА ОТ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ВАЛИДАЦИИ ВАРИАНТОВ

Антоненко А.Н., Уланова П.В., Ревкова М.А., Криницына А.А., Беленикин М.С.

ООО «Эвоген», медико-генетическая лаборатория, Москва, Россия

Введение: Современный прогресс и уровень развития высокопроизводительного секвенирования (NGS), существующих алгоритмов биоинформатики и обработки получаемых данных секвенирования все больше ставят вопрос о пороге и критериях применимости использования капиллярного секвенирования (КС) методом Сенгера для валидации найденных вариантов, особенно активно — последние 10 лет. КС используется с середины 90х годов и, за неимением более точного метода, считается своего рода “золотым стандартом” и принимается медицинским сообществом в качестве необходимого валидационного инструментария для выдачи медицинских заключений.

На сегодняшний день накоплен внушительный объем информации о сравнении результатов NGS экзомов и генных панелей и КС. Уже можно считать общепринятым отсутствие необходимости валидации КС «высококачественных вариантов» NGS (глубина прочтения не менее 20x, представленность варианта не менее 20%, качественный вызов варианта) [1], так как при валидировании всех результатов NGS особенности КС приводят скорее к снижению эффективности тандема NGS+КС и увеличивают затраты на исследования и сроков выдачи заключений. При экзомных исследованиях такую валидацию рекомендуется проводить очень выборочно, например для небольших найденных инсерций/делеции, а также однонуклеотидных вариантов, которые по результатам биоинформатического анализа имеют качество варианта ниже порогового [2], однако численные значения порогов в литературных данных приводятся редко и определяются в каждой лаборатории индивидуально (например [3]: 5x, представленность варианта от 35%, QUAL 139).

А вот информация о сравнении результатов полногеномного секвенирования (WGS) и КС в литературе, в отличие от валидации целевых NGS исследований, представлена очень ограниченно. В отличие от целевого секвенирования методология проведения WGS предполагает максимальную однородность результатов секвенирования, а использование PCR-free подхода позволяет получить данные, которые априори имеют наибольшую равномерность охвата по всей длине генома, наименьшее число экспериментальных артефактов и меньшие требования по необходимой глубине секвенирования [4]. Постоянное увеличение объема и качества

получаемых данных приводит к необходимости пересмотра ранних рекомендаций по применению КС. Так, в рекомендациях 2022 г акцент делается на необходимости позитивной переоценки использования WGS при диагностике и обновлению ранее опубликованных руководств по проведению NGS с указанием что варианты, соответствующие заранее определенным показателям качества обработки данных, не требуют дополнительной валидации и подтверждения с помощью любого альтернативного метода [5].

Цель данной работы заключалась в формулировке пороговых критериев, при достижении которых валидация варианта, полученного в результате WGS, с помощью КС может считаться избыточной и оценке доли таких образцов в валидируемом сете.

Материалы и методы: Всю экспериментальную работу и биоинформатический анализ данных WGS и КС, проводили на базе лаборатории Эвоген. Протоподготовку образцов для WGS на платформе MGI в режиме PE150 проводили по PCR-free протоколу с предварительной ферментативной фрагментацией. Все варианты, направляемые на валидацию с применением КС секвенировали на ABI3500 по стандартным протоколам производителя.

Основные результаты: Из большого количества уникальных точек, валидированных нами с использованием КС в качестве набора для оценки эффективности лабораторной валидации были взяты 1392 уникальные точки, валидированные за первое полугодие 2023 года для лиц с редкими (орфанными) заболеваниями. Особенностью этого сета является высокий процент (~40%) вариантов, расположенных в сложных для работы участках генома (отклонение GC-состава, повторы, псевдогены). Из 100% (1392): ~97% (1350) направленных на валидацию вариантов были подтверждены (результаты КС полностью совпали с результатами WGS), ~1,7% (24) направленных вариантов требовали уточнения и экспертного просмотра, в результате которого при валидации было получено подтверждение (согласование данных NGS и результатов КС; формальное их расхождение объясняется наличием в непосредственной близости от валидируемого варианта дополнительных вариантов, включая инделы), 1,3% (18) составили технические отказы. Полученные результаты позволяют оценить часть критериев (пороговых значе-

ний) следующим образом: глубина прочтения: 10x и более, представленность аллельного варианта 15% и более, вариант располагается в области, не имеющей псевдогенов, в ближайшем окружении к валидируемому варианту отсутствуют множественные и сложные для амплификации и аннотации инсерции / делеции, протяженные tandemные и однонуклеотидные повторы. Оценка порогового значения качества вызова варианта в результате работы биоинформатического пайплайна не приводится в данной работе, так как его формулирование требует расширенного пояснения.

Выводы: Достигнутые в настоящее время высокие качество результатов высоко-производительного секвенирования (включая полногеномные исследования) и обработки данных позволяет говорить об избыточности потоковой рутинной валидации всех вариантов с помощью КС методом Сэнгера. Полученные данные показывают, что валидация 90-95% всех направляемых на валидацию вариантов избыточна и эти варианты легко идентифицируются *in silico* при анализе данных полногеномного секвенирования. Секвенирование методом Сэнгера действительно может быть полезным в 1-2% наиболее сложных случаев (например, в случае вставок/делеций размером до 30 п.н.о., в случае если рядом с валидируемым вариантом в непосредственной близости располагаются дополнительные варианты, или области с повторами, GC-богатые области и т.д.),

однако большинство и таких вариантов возможно качественно проанализировать *in silico* при дополнительной расширенной биоинформатической обработке данных NGS. Пороговые значения для непроведения валидации КС следующие: глубина прочтения: 10x и более, представленность аллельного варианта 15% и более, вариант располагается в области, не имеющей псевдогенов, в ближайшем окружении к валидируемому варианту отсутствуют множественные и сложные для амплификации и аннотации инсерции / делеции, протяженные tandemные и однонуклеотидные повторы. Однако валидация самих клинических кейсов (т.е. подтверждение действительной каузативности найденных вариантов) по прежнему необходима в качестве инструментария валидации работы биоинформатиков-интерпретаторов и врачей и метод Сэнгера является одним из наиболее часто используемых инструментов для проведения сегрегационного анализа.

Дополнительная информация: Для проведения всех лабораторных исследований были получены информированные согласия.

Литература: (1) Artech-Lypez A., et al. *Sci Rep.* 2021. V.11. P.5697. (2) Strom S.P. *Genet Med.* 2014. V.16(7). P.510. (3) Bauer P. *Genet Med.* 2019. V.21(1). P.53. (4) Meynert A.M. *BMC Bioinformatics.* 2014. 15(1). P.247. (5) Souche E. *European Journal of Human Genetics.* 2022. V.30. P.1017.

Раздел 18. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ТРАНСФУЗИОЛОГИИ И ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ CES1, PON1 И CER1 В ВЫБОРКЕ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА, ПРИНИМАЮЩИХ ПРОТИВОПРОМБОТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Кипень В.Н.¹, Зотова О.В.², Добыш О.И.¹, Королева Т.С.², Бейманов А.Э.², Стельмашок В.И.², Лемеш В.А.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² РНПЦ «Кардиология», Минск, Беларусь

Введение. Эффективность лечения заболеваний сердца и сосудов в большей степени зависит от комплексного подхода при лечении больных ишемической болезнью сердца (ИБС). Распространенность ИБС, ее роль как причины утраты трудоспособности, снижения качества жизни значительной части населения, определили постоянное совершенствование методов лечения различных форм этой патологии. Рост эффективности интервенционных вмешательств на фоне расширения показаний к ним определяет дальнейшее внедрение их в практику здравоохранения в развитых странах мира. В настоящее время в мире ежегодно проводится более 2 млн. процедур чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) [1].

Коронарное стентирование все шире используется у пациентов как с острым коронарным синдромом (ОКС), так и при стабильных формах ИБС. Несмотря на постоянное совершенствование техники ЧКВ, грозным осложнением остается тромботическая окклюзия стентированного участка коронарной артерии (КА). Пусковым моментом для нее служат нарушение целостности атеросклеротической бляшки с обнажением субэндотелиальных структур с высвобождением тканевого фактора, что приводит к активации тромбоцитов и каскада коагуляции [2,3]. Очевидно, что для предотвращения такого осложнения как тромбоз, целесообразным является применение двойной антитромбоцитарной терапии (ДАТ) — комбинация ацетилсалициловой кислоты (АСК) и клопидогрела.

В настоящее время золотым стандартом изучения функции тромбоцитов является трансмиссионная или

оптическая агрегометрия. Также все шире исследуется вопрос о генетической составляющей недостаточной реакции на прием клопидогрела, ответ на который заключается в его фармакокинетике и фармакогенетике.

Цель и задачи. Определить частоту распространенности минорных аллелей для SNP (Single Nucleotide Polymorphism) генов CES1, PON1 и CER1, по данным GWAS (Genome-Wide Association Study) ассоциированных с развитием тромбозов среди пациентов с ИБС.

Материалы и методы. Материалом для молекулярно-генетических исследований являлась венозная кровь 120 пациентов с клинически верифицированным диагнозом ишемическая болезнь сердца (МКБ-10 I20-I25). Венозная кровь отбиралась в пробирки с цитратом натрия 3,8% Citrate (9NC 0,129M) IMPROVE. Выделение ДНК проведено с использованием набора на магнитных частицах MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra Kit (Applied Biosystems™, США). Средняя концентрация составила 58,2 нг/мкл (260/280 — 1,979). С использованием технологии KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) определены генотипы для клинически значимых полиморфизмов rs71647871 (CES1), rs662 (PON1) и rs55670713 (CER1).

Основные результаты. В таблице приведены полученные результаты. Выявлено, что для rs71647871 (CES1) частота минорного аллеля Т составила 0,83% (95% ДИ 0,00-2,00), rs662 (PON1) аллель С — 26,67% (95% ДИ 20,95-32,39), rs55670713 (CER1) аллель С — 8,75% (95% ДИ 5,09-12,39).

Полиморфизм	Ген	Генотип	Кол-во пациентов	Частота генотипа, %
rs71647871	CES1	CC	118	98,33
		CT	2	1,67
		TT	–	–
rs662	PON1	CC	9	7,50
		CT	46	38,33
		TT	65	54,17
rs55670713	CER1	CC	2	1,67
		CT	17	14,17
		TT	101	84,17

Показано, что при сравнении с популяционными данными, полученными в рамках крупномасштабного проекта 1000Genomes для популяции «Europe» наибольшие отклонение частоты распространенности минорных аллелей было характерно для rs55670713 (CER1) и составило 5,19%. Наличие двух и более минорных аллелей по исследуемым полиморфизмам было выявлено у 6,67% пациентов, трех — у одного пациента.

Заключение. В дальнейшем планируется продолжить молекулярно-генетические исследования (увеличение объема выборки до 150 пациентов с ИБС), а также провести ассоциативный анализ с клинико-патологической картиной заболевания.

Исследование выполнено в рамках проекта «Разработать и внедрить ДНК-технологии для персонализированного применения антитромботических лекарств при ише-

мической болезни сердца», ГП «Научно-технологические технологии и техника» на 2021-2025 гг., подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии»

Литература:

1. Роль генетического тестирования в подборе оптимальной антитромботической терапии в лечении больных ишемической болезнью сердца / С.Т. Мацкеплишвили, Я.Э. Арутюнова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2014. Т.13(2). С.71-75

2. Рекомендации по антитромботической терапии при чрескожных вмешательствах на коронарных артериях / А.Л. Комаров // Атеротромбоз 2010. Т.1. С.87-95

3. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents // M. Pfisterer [et al.] // JACC. 2006. V.48. pp.2584-2591.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИЧ У ДОНОРОВ КРОВИ В РОССИИ И ЗА РУБЕЖОМ

Д.А. Федуленко¹, О.В. Евсеенко¹, С.И. Кузнецов³, Е.Б. Жибурт²

¹ ГКУЗ «Центр крови Ленинградской области», Тосно, Россия

² ГБУЗ «Самарская областная клиническая станция переливания крови», Самара, Россия

³ ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. Риск передачи вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) при переливании крови в настоящее время низок, но не равен нулю. Потенциальными детерминантами распространенности и заболеваемости ВИЧ среди доноров могут быть показатели, наблюдаемые в общей популяции. Сильные корреляции между этими показателями у населения и доноров региона свидетельствуют о неэффективности: а) просвещения доноров, б) их осведомленности о риске гемотрансмиссивных инфекций и в) в целом — системы отбора доноров. Отсутствие корреляции или наличие «выбросов» по отношению к кривой регрессии, свидетельствует о том, что на остаточный риск гемотрансмиссивного ВИЧ влияют другие факторы, помимо показателей популяционной ВИЧ-инфекции, и необходимы дополнительные меры профилактики гемотрансмиссивных инфекций среди доноров.

Цель и задачи. Сравнить показатели распространенности и заболеваемости (встречаемости, инцидентности) ВИЧ у доноров крови и среди населения в целом в Самарской и Ленинградской областях и других странах. Определить их связь со структурой донорского контингента и уровнем распространения ВИЧ среди населения в целом.

Материалы и методы. Изучили количество ВИЧ-положительных донаций в серологическом и NAT-тестах у первичных и повторных доноров в Самарской (306846 донаций) и Ленинградской областях (238411 донаций). Данные с 2007 по 2016 год сопоставили с аналогичными показателями 6 стран: Бразилия (Сан-Паулу), Италия, Испания (Страна Басков), Япония, Норвегия, Австралия.

Показатели распространенности и заболеваемости ВИЧ среди населения в целом за 2007–2016 годы были рассчитаны путем усреднения годовых статистических

данных. В качестве косвенного показателя заболеваемости ВИЧ среди доноров использовали долю ВИЧ-положительных доноров среди повторных доноров. В качестве второго, более прямого измерения заболеваемости использовали только NAT-положительные доноров.

Сопоставили распространенность ВИЧ среди первичных доноров и заболеваемость ВИЧ среди доноров в каждом регионе с распространенностью ВИЧ среди населения в целом. Сравнили показатели частоты донаций, положительных только в NAT, рассмотрев возможное влияние показателей заболеваемости ВИЧ среди населения в целом.

Основные результаты. В изученных российских регионах:

— распространенность ВИЧ в 2-3 раза выше, чем в Бразилии, Италии, Испании и более чем в 10 раз выше по сравнению с Японией и Австралией,

— показатель ежегодной заболеваемости ВИЧ в 3-8 раз превышает аналогичные показатели Бразилии, Италии и Испании и более чем в 10 раз — показатели Японии, Норвегии и Австралии.

По всем показателям выявления инфекций у первичных и повторных доноров российские регионы превосходят исследуемые зарубежные страны.

Распространенность ВИЧ среди жителей региона положительно коррелирует не только с заболеваемостью ВИЧ в регионе ($r=0,794$, $p=0,019$), но и с долей серопозитивных лиц среди первичных доноров ($r=0,794$, $p=0,019$).

Заболеваемость ВИЧ среди жителей региона положительно коррелирует с:

— долей первичных доноров ($r=0,860$, $p=0,006$),

— долей серопозитивных лиц среди первичных доноров ($r=0,974$, $p<0,001$),

— долей NAT-положительных лиц среди первичных доноров ($r=0,781$, $p=0,022$),

— долей женщин как среди первичных ($r=0,763$, $p=0,046$), так и среди повторных доноров ($r=0,810$, $p=0,027$).

Доля только-NAT-положительных донаций не коррелирует с заболеваемостью населения, но положительно коррелирует с количеством серопозитивных донаций ($r=0,893$, $p=0,003$). Этот показатель в российских регионах не менее чем в 5 раз превышает аналогичные показатели зарубежных стран.

Распространенность ВИЧ у населения региона в зарубежных странах (за исключением Бразилии) не менее чем в 10 раз превышает аналогичный показатель у первичных доноров. В российских регионах этот показатель (отношение распространенности ВИЧ у населения и первичных доноров) существенно ниже. Он обратно коррелирует с долей первичных доноров ($r=-0,710$, $p=0,049$).

Отношение распространенности ВИЧ у населения и первичных доноров положительно коррелирует со вторым исследуемым показателем — отношением встречаемости ВИЧ у жителей региона к встречаемости ВИЧ у повторных доноров ($r=0,824$, $p=0,012$).

Значения последнего показателя в зарубежных странах — от 68,0 (Норвегия) и 23,79 (Австралия) до 2,21 (Бразилия).

Заключение

1. Распространенность ВИЧ среди жителей региона положительно коррелирует с заболеваемостью ВИЧ в регионе и с долей серопозитивных лиц среди первичных доноров.

2. Заболеваемость ВИЧ среди жителей региона положительно коррелирует с долей первичных доноров, долей серопозитивных лиц среди первичных доноров, долей NAT-положительных лиц среди первичных доноров, долей женщин.

3. Доля только-NAT-положительных донаций не коррелирует с заболеваемостью населения, но положительно коррелирует с количеством серопозитивных донаций ($r=0,893$, $p=0,006$). Этот показатель в российских регионах не менее чем в 5 раз превышает аналогичные показатели зарубежных стран.

4. Работа службы крови Самарской и Ленинградской областей проходит в более сложной эпидемиологической обстановке по сравнению с 6 зарубежными странами, что обуславливает повышенную распространенность и встречаемость ВИЧ-инфекции у доноров крови и её компонентов.

5. Необходимы дополнительные меры профилактики гемотрансмиссивных инфекций у доноров

6. Для бенчмаркинга эффективности инфекционной безопасности в службе крови предложены 2 показателя:

● отношение распространенности ВИЧ у жителей региона к распространенности ВИЧ у первичных доноров крови,

● отношение встречаемости ВИЧ у жителей региона к встречаемости ВИЧ у повторных доноров крови и её компонентов.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИММУНОГЕНЕТИКИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧЕК, ВЛИЯНИЕ АНТИ-HLA АНТИТЕЛ

Грачева Л. А., Петрова Л. В., Латышева М. Н., Румянцев А. Л.

РДКБ— филиал ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Изучение влияния предсуществующих и посттрансплантационных анти-HLA антител является актуальной проблемой современной трансплантации почек.

Цель исследования — изучение влияния разного уровня и различной специфичности анти-HLA антител на успех трансплантации почек.

Материалы и методы. В исследование было включено 320 пациентов ($12,5 \pm 0,8$ лет) за период 2011 г.— 2022 г. до и после пересадки почки, у которых определяли специфичность, среднюю интенсивность флюоресценции (MFI) и выявляли процент панель реактивных анти-HLA антител (сPRA) с использованием микросфер (технология Lumindex 200). Идентифицировали комплемент— связывающие C1q антитела к антигенам HLA (наборы C1q screen One Lambda).

Результаты. У 320 детей выявляли предсуществующие антитела. Все дети с сPRA были разделены на 2 группы в зависимости от уровня сPRA ($\leq 50\%$, $\geq 50\%$). Степень клубочковой почечной фильтрации (СКФ) (Schwartz) оценивалась у детей через 1, 6, 12, 18, 24 месяцев после трансплантации. СКФ почечного трансплантата у детей с сPRA $\leq 50\%$ не отли-

чается от пациентов без предсуществующих анти-HLA-антител в течение 2 лет после трансплантации. СКФ трансплантата детей с сPRA $\geq 50\%$ была хуже, чем у пациентов без предсуществующих анти-HLA-антител, начиная с 1 месяца после трансплантации. В посттрансплантационном периоде у 148 детей (46,3%) выявляли *de novo* анти-HLA AT и часто к антигенам HLA II класса. Антитела были к антигенам DQ локуса HLA с преобладающим профилем специфичностей: DQ2, DQ4 и DQ6, и с сPRA: 2-18%. Из них, у семи пациентов данные антитела были высоко реактивны — (MFI была 1800— 22000) и связывали C1q компонент комплемента. Антитело опосредованное отторжение почек (AMBR) развилось у 20 детей с высоким уровнем сPRA и MFI. Терапия ритуксимабом, добавленным в качестве дополнительного компонента в фазу индукции иммуносупрессии у детей с предсуществующими анти-HLA антителами уменьшала частоту AMDR почек. После терапии с учётом данных современного выявления анти-HLA антител продолжительность жизни трансплантата почки увеличилась с трёх до 10— 15 лет.

Заключение. Высокий процент панель реактивных анти-HLA антител и высокий уровень средней интенсив-

ности флюоресценции анти-HLA-антител ухудшает функцию почечного трансплантата у детей и увеличивает риск развития антитело — опосредованного отторжения почек.

Проводимая иммуносупрессивная терапия отменяет антитело опосредованное отторжение органа и повышает срок жизни трансплантата почки.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАНОВЛЕНИЯ ДОНОРСКОГО ХИМЕРИЗМА У ДЕТЕЙ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Морозова Г.А., Шубина Ю.Ф., Бронин Г.О., Бурцев Е.А.

ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница ДЗМ», Москва, Россия

Введение. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является одним из эффективных методов лечения пациентов с онкогематологическими заболеваниями. Одним из главных показателей успешной трансплантации является установление полного донорского химеризма. В Морозовской детской городской клинической больнице для оценки приживления донорских гемопоэтических клеток был применен метод количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) в реальном времени путем определения InDel (insertion/deletion) полиморфизмов. Чувствительность данного метода по оценкам производителя составляет до 0,01% при 10 нг исследуемой ДНК. Для большей информативности исследовали, как общий лейкоцитарный химеризм, так и отдельные популяции клеток.

Цель и задачи проанализировать динамику химеризма общего и линейно-специфического, изучить взаимосвязь с развитием рецидива заболевания у пациентов после аллогенной ТГСК.

Материалы и методы. Мы исследовали уровень химеризма после 70 ТГСК у 63 пациентов (7 детей получили вторую ТГСК) в возрасте от 1 до 17 (медиана 11,3) лет, 45 больных с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и 18 — острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), выполненных за период с 2020 года по 2023 год. Всем пациентам было проведено миелоаблативное кондиционирование.

Определение химеризма выполнялось всем детям на +30, +60, +100, +180, +365 сутки после ТГСК, из них 25-ти в дополнительные точки на +70, +80, +110, +130, +150, +160, +210, +230, +270, +300 по показаниям. Полный донорский химеризм (ДХ) оценивали при обнаружении более 99% клеток в костном мозге/ периферической крови с донорским генотипом; смешанный химеризм (СХ) — при выявлении менее 99% клеток донора с персистирующими или вновь появляющимися клетками реципиента после ТГСК. В общей сложности 65 пациентам была проведена родственная ТГСК: 52 — от гаплоидентичных родителей (из которых 5 повторных), 2 — от гаплоидентичного сиблинга; 11 — от HLA идентичных сиблингов. 5 пациентам была осуществлена неродственная ТГСК от доноров с совместимостью 10/10 (из которых 2 повторных).

Материалом для исследования служили образцы периферической крови и/ или костного мозга пациентов до и после трансплантации. Геномную ДНК выделяли методом связывания и осаждения на мембране с силикогелем (QIAamp DNA MiniBlood Kits, Германия) и (Cleanup Standard

Евроген, Россия). Клеточные линии CD3+ (Т— лимфоциты), CD19+ (В— лимфоциты), CD34+ (стволовые клетки) получали методом положительной магнитной сепарации с использованием парамагнитных сфер (Invitrogen, США). Генотипирование маркеров выполняли с помощью набора KMRtype (GenDX, Нидерланды). Исследование химеризма проводили с использованием реагентов KMRtrack (GenDX, Нидерланды). Процентное соотношение клеток донора и реципиента рассчитывали с помощью программного обеспечения производителя KMRengine (GenDX, Нидерланды). Статистическую обработку данных проводили с использованием точного критерия Манна-Уитни и коэффициента корреляции гамма с помощью Statistica 10.0.

Основные результаты. По результатам исследования пациенты были разделены на две группы в зависимости от уровня обнаружения клеток. Группа А — пациенты, у которых на +30 день ДХ > 99% и пациенты с уменьшающимся СХ, на 365 день достигшие ДХ и группа Б — пациенты у которых на +30 день СХ < 99% и с уменьшающимся СХ, на 365 день не достигшие ДХ. За период исследования у пациентов группы А не отмечались статистически значимые колебания в показателях общего химеризма. В группе Б он был ниже на протяжении практически всего периода исследования, однако статистически значимые различия показателя общего химеризма у пациентов группы Б по сравнению с показателем у больных группы А выявлялись лишь на 60 сутки — в 1,86 раз ($p=0,024$).

Исследование химеризма в популяции клеток CD3+ показало, что в группе Б его количественный показатель был выше по сравнению с группой А: на 30 сутки — в 8,1 раз ($p=0,001$), на 60-70 сутки — в 4,5 раза ($p=0,002$), на 80-100 сутки — в 6,5 раз ($p=0,0083$), на 110-130 сутки — в 1,6 раз ($p=0,52$), на 150-160 сутки — в 5,1 раз ($p=0,22$), на 180 сутки — в 6,6 раз ($p=0,0032$), на 210-230 сутки — в 2,5 раз ($p=1,0$), 270-300 сутки — в 2,4 раза ($p=0,29$), на 365 сутки — в 2,8 раза ($p=0,47$). Во всех группах было отмечено два периода подъема уровня химеризма: на 110-130 сутки в группе А и на 150-160 сутки в группе Б, на 270-300 сутки в обеих группах.

Исследование химеризма в популяции лейкоцитов CD19+ показало, что величина показателей и динамика изменений схожи с таковыми в популяции лейкоцитов CD3+: в группе Б он на всем протяжении был выше по сравнению с группой А: на 30 сутки — в 3,7 раз ($p=0,0043$), на 60-70 сутки — в 3,9 раз ($p=0,0014$), на 80-100 сутки — в 4,9 раз ($p=0,026$) и на 180 сутки — в 2,5 раза ($p=0,0027$), 110-130

сутки — в 2,1 раз ($p=0,73$), на 150-160 сутки — в 2,7 раз ($p=0,18$), на 210-230 сутки — в 5,7 раз ($p=0,34$), 270-300 сутки — в 2,3 раза ($p=0,38$), а 365 сутки — в 1,2 раза ($p=0,45$). Во всех группах выявлено два периода подъема уровня химеризма: в группе А на 110-160 сутки и на 270-300 сутки, в группе Б — на 150-160 и 210-230 сутки.

При исследовании химеризма популяции клеток CD34+ в группе А отмечаются низкие значения в первые 100 суток, затем увеличение в 2,1 раза на 110-130 сутки, и еще в 1,2 раза на 150-160 сутки. К 180 суткам показатель химеризма снижался в 1,9 раз, к 210-230 суткам — еще в 5,5 раз, а к 270-300 суткам был отмечен рост показателя в 3,8 раз. В группе Б выявлен увеличивающийся СХ химеризм в первые 100 суток (в 5,5 раз выше по сравнению с группой А на 30 сутки ($p=0,0005$), в 3,9 раз — на 60-70 сутки ($p=0,0026$), в 4,6 раз — на 80-100 сутки ($p=0,013$)). Затем показатель снижался в 2,5 раза и становился ниже аналогичного показателя в группе А на 11,8% ($p=0,91$) на 110-130 сутки и на 12,8% ($p=0,74$) на 150-160 сутки. К 180 суткам был отмечен небольшой рост показателя, с последующим снижением. Резкое увеличение показателя выявлено на 270-300 день: в группе Б он в 8,6 раз превышал таковой группы А ($p=0,000001$). В

дальнейшем в обеих группах показатель снижался. За время наблюдения в девяти случаях отмечено развитие рецидива у семерых пациентов с ОЛЛ и у двоих детей с ОМЛ.

Анализ коэффициента гамма показал наличие статистически значимой корреляции средней степени между вероятностью развития рецидива и величиной общего химеризма на 80-100 сутки после ТГСК ($G=0,65$, $p=0,012$) у пациентов группы А и сильной корреляционной связи между вероятным развитием рецидива и величиной химеризма по CD3+ ($G=1,0$, $p=0,04$) на 270-300 сутки после ТГСК у пациентов группы Б.

Выводы. Таким образом, исследование химеризма в динамике позволяет оценить не только приживление донорских гемопоэтических клеток, но и потенциально спрогнозировать риск развития рецидива онкологического заболевания. Снижение показателей общего донорского химеризма является предиктором рецидива на ранних сроках после ТГСК, а снижение линейного донорского химеризма по CD3+ лимфоцитам — на поздних сроках. Для принятия адекватных терапевтических решений необходимо увеличить число контрольных точек определения общего и линейного химеризма после 150 дня от ТГСК.

SEARCHING THE WAY TO INDIVIDUALIZE INDUCTION IMMUNOSUPPRESSION OF GRAFTED ORGANS

Abramov V.

A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Transplantology and Artificial Organs Dept., Moscow, Russia

Previously we have correlated early kidney allograft loss with a limited number of mismatched HLA class I allogeneic epitopes (public specificities) recognized by recipient in a self-HLA-DR-restricted manner and described merely nine immunogenic recipient/donor HLA combinations (i-combinations). We guess the i-combinations mentioned should conduct the mode of posttransplant immunotherapy. Here we investigate the efficacy of induction therapy with anti-CD25 monoclonal antibodies (moabs) to prevent the rejection of 388 deceased donor kidney (DDK) allografts. There appeared to be 144 (37%) transplants at risk. To prevent episodes of acute

rejection anti-CD25 moabs were given to 49 (13%) patients. The induction therapy with anti-CD25 moabs did not benefit the one-year survival of kidneys grafted in the absence of any i-combination. On the contrary, the one-year survival of the grafts at risk improved when the therapy was supplemented with anti-CD25 prophylaxis (91% vs 71%; Relative Risk=1.1; 95% CI 0,99-1,22; $p=.08$), although did not reach the level of significance. We conclude that induction therapy with anti-CD25 moabs improves the survival of not all DDK grafts but only the ones transplanted in the presence of i-combinations. To prove the conclusion the study should be continued.

STUDY OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF THE INTERLEUKIN 1 BETA GENE IN KIDNEY RECIPIENTS WITH DELAYED GRAFT FUNCTION

Abramov V.

A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Transplantology and Artificial Organs Dept., Moscow, Russia

A severe complication that not infrequently comes out after kidney transplantation from a postmortem donor is delayed graft function (DGF). On date, a reliable prediction of its development needs a solution. Our report presents data obtained from the study of four SNPs of the IL1B gene,

namely 3953 C>T; 592 C>A; 819 C>T, and 1188 A>C in allograft recipients. The results obtained were compared with the graft function in the immediate postoperative period. The criterion for DGF was the need to continue haemodialysis replacement therapy during the first week after sur-

gery. DGF was observed in 12 of 27 kidney grafts harvested from a postmortem donor. For typing SNPs, the method of adjoining allele-specific probes was used in combination with the analysis of melting curves. When assessing differences in the frequency of the studied phenotypes, Fisher's exact test was used. The development of DGF of the graft harvested from a postmortem donor showed a pronounced

statistically significant relationship with the presence of the T allele of the IL1B: 3953 C>T polymorphism in the recipient (5/5 DGF and 0/5 immediate function for T, pFisher = 0,01) and, at the same time, a weak relationship with other studied polymorphisms of this gene. Further multivariate analysis should be carried out to confirm the reliability of the data obtained.

EXTRA DELAYED GRAFT FUNCTION RISK AFTER TRANSPLANTATION OF ISCHEMIC KIDNEYS RETRIEVED FROM A POSTMORTEM DONOR HOMOZYGOUS FOR THE 4G ALLELE OF THE PAI-1 GENE

Abramov V.

A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Transplantology and Artificial Organs Dept., Moscow, Russia

Delayed kidney graft function (DGF) is a poor prognostic sign. It is believed the duration of cold ischemia of the organ retrieved to increase the risk of manifestation of DGF after transplant. PCR-Taqman technique was used to type for PAI-1 gene mutation -675 5G → 4G to discover the associations of ischemic kidney DGF with the inherited polymorphism of human plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene in 206 postmortem donors. There were 126 grafts after short 7-17 hrs static cold ischemia (group I) and 80 grafts after long 18-30 hrs static cold ischemia

(group II). In both groups, the DGF rates were 29 and 28%, resp. (p=ns). The frequencies of homozygous 4G/4G genotype were 36 and 35%, resp. (p=ns). In group II the rates of DGF were 44% for 4G/4G renal grafts but just 21% for the rest (Relative Risk = 2,08; 95% CI = 1,07-4,03; p=0,03). In group I no significant associations of 4G/4G PAI-1 donor genotype with the manifestation of DGF were found. Our study revealed renal grafts harvested from 4G/4G PAI-1 postmortem donors to be disposed to suffer from DGF after long-lasting static cold ischemia.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ В СЛОЖНЫХ СЛУЧАЯХ ПОСТРАНСФУЗИОННОГО ХИМЕРИЗМА

Чумак А.А.¹, Беякова В.В.¹, Майорова О.А.¹, Момотюк К.С.¹, Пухликова Т.В.¹, Рассолова С.В.¹, Личман Ж.С.¹, Хлебникова М.А.²

¹ГБУЗ «Центр крови имени О.К. Гаврилова ДЗМ», Москва, Россия

²ГБУЗ «Детская городская клиническая больница имени Н.Ф. Филатова», Москва, Россия

Введение. Трансфузии эритроцитсодержащих компонентов (ЭСК), отличающихся по антигенному составу от фенотипа реципиента, нередко приводят к выявлению двойной популяции эритроцитов в периферической крови после переливания. В ряде случаев, уровень донорского химеризма настолько высок, что серологическое типирование после трансфузии отражает только антигены эритроцитов донора и не выявляет собственные антигены эритроцитов реципиента. К таким состояниям приводит, в частности, операция заменного переливания крови (ОЗПК), выполняемая при гемолитической болезни плода и новорожденного (ГБН). Отсутствие преемственности между медицинскими организациями по передаче результатов первичного серологического типирования и истории трансфузий также осложняет идентификацию антигенов эритроцитов реципиента, поэтому для переливания используют универсальные ЭСК O Rh-. «Универсальность» таких доноров является довольно условной, поскольку, как правило, они являются носителями фе-

нотипа ccddee, не совместимого с такими фенотипами реципиента как CCee, ccEE и CCEe. При невозможности установить истинный состав антигенов эритроцитов реципиента серологическими методами использование технологий генотипирования является стратегией выбора при подборе ЭСК.

Цель и задачи. Оценить результаты применения генетического типирования антигенов эритроцитов у пациентов после ОЗПК в образцах крови, поступивших на исследование в ГБУЗ «Центр крови им. О.К. Гаврилова ДЗМ».

Материалы и методы. За период 2020-2023 гг. были исследованы 4 пациента, прошедшие процедуру ОЗПК по поводу ГБН в различных медицинских организациях г. Москвы. В 3-х случаях ОЗПК ЭСК O Rh— были перелиты внутритрубно (ВЗПК) для лечения ГБН с конфликтом по антигенам D (пациенты Б. и М.) и антигенам С, К (пациент Д.). У одного ребенка ОЗПК проведена после рождения совместимыми с его фенотипом ЭСК в связи с подозрением на ГБН, обусловленной анти-Е антителами. У матерей в

анамнезе две и более беременностей. Серологическими методами установлена идентичность групповой и резус принадлежности пар мать-ребенок, что не соответствовало клинической картине ГБН, в связи с этим проведено генотипирование образцов крови детей.

Серологическое типирование образцов крови проводили с использованием анализатора IH-1000 и ручными методами с помощью гелевой технологии фирмы Bio-Rad (США, Швейцария) или реагентов ImmuClone/NOVACLONE (Immucor, США). Для исключения интерференции донорскими ядродержащими клетками геномную ДНК реципиентов выделяли из двух источников: периферической крови и буккального эпителия. Генотипирование по системам ABO, RH и KELL проводили методом аллель-специфичной ПЦР (PCR-SSP) на коммерческих реагентах ABO-TYPE, RH-TYPE, KKD (BAG, Германия). Обозначение аллелей проведено согласно международной номенклатуре Рабочей группы по иммуногенетике групп крови Международного общества переливания крови (ISBT).

Основные результаты. У 2-х пациентов с ВЗПК в анамнезе по поводу ГБН, обусловленной анти-D антителами (пациенты Б. и М.) в результате серологического типирования образцов крови, взятых после рождения, определили антигены эритроцитов — O ccddee, которые соответствовали фенотипу матери и перелитым донорским эритроцитам ЭСК O Rh-. Для установления истинного фенотипа пациентов и исключения конфликта по другим антигенам, ДНК реципиентов исследована методом PCR-SSP. По результатам генотипирования установлена групповая и резус-принадлежность пациента Б. (O ccDdEe) и М. (O CcDdee), ГБН, вызванная анти-D антителами, подтверждена. Для последующих трансфузий использовали совместимые по фенотипу компоненты крови.

У реципиента Д. с ГБН, вызванной несовместимостью мать-плод по антигенам эритроцитов С и К, в результате серологического типирования образцов крови, взятых после рождения, определен фенотип O ccddee, Kell-отрицательный, который также аналогичен перелитым ЭСК

O Rh— и материнскому набору антигенов. Методом PCR-SSP у ребенка обнаружены полиморфизмы *ABO*O.01.01*, *RHD*01(Dd)*, *RHCE*C,c,e*, *KEL*01(Kell)*02(cellano)*, что соответствует фенотипу O CcDde Kk. Дополнительно получены результаты серологического типирования отца, который тоже является обладателем фенотипа O CcDde Kk. На основе проведенных исследований сделан вывод, что мать была иммунизирована антигенами С и К во время предыдущих беременностей (в анамнезе 5 беременностей, 1 роды), и анти-С, -К антитела стали причиной развития ГБН у реципиента Д.

Ребенку Я. с подозрением на ГБН, обусловленной анти-Е антителами, была выполнена ОЗПК ЭСК, которые соответствовали определенному при рождении фенотипу O CcDde. Наличие анти-Е антител в крови матери и ребенка не соответствовало результатам серологического типирования фенотипа ребенка. Для исключения ошибки реципиенту было выполнено генотипирование и подтвержден фенотип — O CcDde. При выяснении причин иммунизации матери, установлено, что отец имеет группу крови O CcDde. Дети от предыдущих беременностей имеют аналогичный состав антигенов эритроцитов. Следовательно, мать была иммунизирована антигеном Е ранее, однако, анти-Е антитела не являются для ребенка Я. клинически значимыми и не могут вызвать ГБН. Конфликт, связанный несовместимостью мать-плод по антигену Е, был исключен.

Таким образом, методами генотипирования были установлены причины аллоиммунизации матерей и проведена диагностика ГБН у детей. Все результаты типирования, полученные при анализе ДНК из периферической крови и клеток буккального эпителия, показали 100% совпадение.

Заключение. Исследование антигенов групп крови молекулярно-генетическими методами является ценным вспомогательным инструментом для установления истинного фенотипа в случае эритроцитарного химеризма, что в свою очередь, обеспечивает безопасность гемотрансфузий, а также позволяет рациональнее использовать антиген-негативные ЭСК в учреждении.

АНАЛИЗ ДАННЫХ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ МАРКЕРОВ ГЕМОТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ У ДОНОРОВ КРОВИ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ Г.О. ТОЛЬЯТТИ И Г.О. СЫЗРАНИ ПОСЛЕ ЦЕНТРАЛИЗАЦИИ ТЕСТИРОВАНИЯ

Кудинова Е.В., Кузнецов С.И., Киселева Е.В., Суслина О.В., Позднякова Е.А.

ГБУЗ «Самарская областная клиническая станция переливания крови», Самара, Россия

Введение. В 2023 году произошла реорганизация службы крови Самарской области. Основной целью стала централизация тестирования образцов донорской крови на маркеры гемотрансмиссивных инфекций и проведение иммуногематологических исследований в лабораториях ГБУЗ «Самарская областная клиническая

станция переливания крови» (ГБУЗ СОКСПК) из групп подготовки донорской крови и ее компонентов г.о. Тольятти и г.о. Сызрани. Для этой цели были разработаны: схема доставки путем организации регулярного транспортного сообщения и приема биологического материала; утвержден 2-х сменный график работы, что позволило

выполнять исследования в день донаций; организованы рабочие автоматизированные места (АРМ); в рамках информационной системы службы крови Самарской области разработан модуль приема пробирок с контролем отгрузки и проверкой комплектности образцов для лабораторий; разработан алгоритм внесения результатов исследований и их регистрация в единой информационной системе с возможностью формирования протоколов исследований по виду донорства; утверждена внутренняя нормативная документация, регламентирующая проведение лабораторных исследований. Централизация тестирования стала возможной за счет оснащения высокотехнологичным оборудованием лаборатории иммунологических исследований на ВИЧ и другие инфекции ГБУЗ СОКСПК: отдел молекулярно-биологических исследований — 2-е линейки автоматизированный комплекс Cobas s 201 (Roche); отдел ИФА/ИХЛА исследований — иммуноферментный анализатор EVOLIS — 3, автоматический анализатор Architect i 2000 (Abbott) — 2, анализатор автоматический иммунохимический модульный ALINITY I (Abbott) — 2.

Цель. Проанализировать данные по выявлению маркеров гемотрансмиссивных инфекций среди доноров г.о. Тольятти и Сызрани с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) после централизации тестирования.

Материалы и методы. Тестирование молекулярно-биологическим методом проводилось в формате минипулов, состоящих из 6-ти образцов доноров крови (экстракция нуклеиновых кислот из 1 мл плазмы минипула) методом полимеразной цепной (ПЦР) реакцией с использованием набора Cobas TagScreen MPX Test, версия 2.0 (для прямого качественного обнаружения РНК вируса иммунодефицита человека, РНК вируса гепатита С и ДНК

вируса гепатита В в плазме крови человека) на системе Cobas s 201. Пулирование образцов плазмы проводилось автоматически с помощью дозатора Hamilton. Для сокращения сроков выдачи результатов исследований иммунологические и молекулярно-биологические исследования проводились параллельно в день донаций. Порядок исследования образцов крови доноров и дальнейший алгоритм исследований при получении положительных результатов выполнялся согласно приказу Минздрава России от 28.10.2020 №1166Н «Об утверждении порядка прохождения донорами медицинского обследования и перечня медицинских противопоказаний (временных и постоянных) для сдачи крови и (или) ее компонентов и сроков отвода, которому подлежит лицо при наличии временных медицинских показаний, от донорства крови и (или) ее компонентов».

Основные результаты. За период с января по июль 2023 года было протестировано 17442 образца крови доноров г.о. Тольятти и г.о. Сызрань. Методом ПЦР получено 4 положительных результата, что составило 0,022% (все 4 донора были отрицательными в иммунологических тестах на антитела к вирусу иммунодефицита человека и антиген р24, поверхностный антиген вирусного гепатита В, антитела к вирусу гепатита С и антитела к возбудителю сифилиса). Из них 2 образца крови доноров содержали ДНК вируса гепатита В; 1 образец — РНК ВИЧ; 1 — РНК ВГС. Оба образца, давших положительный результат на наличие ДНК ВГВ были дополнительно протестированы на суммарные антитела к core — антигену (анти-НВс) вируса гепатита В — оба результата положительные. Все доноры относились к категории активные/кадровые доноры. Вся заготовленная продукция от доноров была утилизирована, донорам оформлен постоянный медицинский отвод.

РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТИРОВАНИЯ С 2018-2022 Г.Г. МЕТОДОМ ПЦР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРОВ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДИТЕЛЯ НА СТАНЦИИ ТЕСАН Г.О. ТОЛЬЯТТИ, Г.О. СЫЗРАНЬ ДО ЦЕНТРАЛИЗАЦИИ И ЗА 7 МЕСЯЦЕВ 2023 ГОДА НА СИСТЕМЕ COBAS S 201 ПОСЛЕ ЦЕНТРАЛИЗАЦИИ.

год	протестировано кроводач	выявлено серонегативных образцов положительных в ПЦР по РНК ВИЧ	выявлено серонегативных образцов положительных в ПЦР по РНК HCV	выявлено серонегативных образцов положительных в ПЦР по ДНК HBV
2023 (7 месяцев)	17 442	1	1	2
2022	30 733	1	1	-
2021	26 414	-	-	-
2020	22 316	-	-	-
2019	34 625	-	3	-
2018	38 998	-	2	1

Выводы.

1. Централизация высокотехнологичных и материалоёмких процессов в работе лабораторий помогает повысить вирусную безопасность выпускаемых компонентов крови и обеспечить надлежащий контроль качества

проводимых лабораторных исследований.

2. Применение молекулярно-биологических методов в службе крови является высокоэффективным в случаях нахождения доноров в серонегативном периоде.

3. Образцы крови доноров, HBs-негативные, могут

быть носителя низких концентраций ДНК вируса гепатита В, выявить которые возможно только при скрининге высокочувствительными NAT-тестами.

4. Применение дополнительного иммунологического маркера анти-НВс вируса гепатита В и сочетание молекулярно-биологических методов позволяет выявлять

инфицированную продукцию, заготовленную от доноров с «молчащей» формой гепатита В.

5. Увеличение загрузки и оптимизации сменности работы оборудования, рациональное использование расходных материалов позволили повысить эффективность работы оборудования.

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ДОНОР-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕСКЛЕТОЧНОЙ ДНК ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРИЖИВАЕМОСТИ ТРАНСПЛАНТАТА В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

А.И. Шевченко

Сибирский федеральный университет

Актуальность. Наилучшим вариантом лечения хронической болезни почек в настоящее время считается трансплантация органов, поскольку при успешном проведении операции увеличивается выживаемость пациентов по сравнению с длительным диализом [1]. Однако, одной из главных проблем остается отторжение аллотрансплантата, вызванное иммунной реакцией реципиента на пересадку чужеродного органа. Поэтому одной из первоначальных задач, с которыми сталкивается сообщество трансплантологов, является обнаружение повреждения до-норского органа на его ранних стадиях с помощью неинвазивного анализа, который может стать долгосрочной моделью мониторинга состояния здоровья аллотрансплантата [2].

В настоящее время для оценки функции почечного трансплантата используется сывороточный креатинин, однако, он является показателем функции нефрона, а не состоянием почечной ткани. К тому времени, когда повышение креатинина в плазме крови, связанное с отторжением органа, становится очевидным, в почке уже происходит значительное повреждение ткани. К тому же, изменения креатинина в плазме чаще всего используются для принятия решения о том, следует ли проводить биопсию почки для выявления отторжения [3].

Недостатки мониторинга трансплантатов твердых органов привели к интересу к стратегиям выявления повреждения или отторжения аллотрансплантата. Один из предложенных способов обнаружения повреждения заключается в измерении количества бесклеточной ДНК (cfDNA) в плазме или моче и способности дифференцировать cfDNA реципиента и cfDNA донора (dd-cfDNA) [4]. Преимущество данного теста в том, что он является неинвазивным, а также способен показать повреждение трансплантата уже на ранних стадиях его появления. Считается, что высвобождение бесклеточной ДНК (cfDNA) в кровотоке является результатом нескольких возможных механизмов, включая гибель клеток в результате апоптоза или некроза, в дополнение к активной секреции различными активированными клетками иммунной системы [4].

Для количественной оценки dd-cfDNA используют цифровую ПЦР (ddPCR) с помощью ряда генетических

маркеров, одним из которых является обнаружение однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), которые присутствуют у донора, но не у реципиента [5].

Цель работы заключалась в оценке возможности использования однонуклеотидных полиморфизмов донор-специфической бесклеточной ДНК как биомаркера для мониторинга функции почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде, а также в сравнении динамики dd-cfDNA с биохимическими показателями, используемыми в рутинной практике.

Объектом исследования служила cfDNA от трех пар донор-реципиент, которым в 2021 году была проведена трансплантация почки в ФСНКЦ ФМБА России (г. Красноярск).

Материалы и методы. Для подбора панели SNP необходимо было найти полиморфизмы с высокой частотой минорных аллелей (MAF) 0,4-0,5. Основываясь на расчетах равновесия Харди-Вайнберга, SNP с MAF от 0,4 до 0,5 имеет почти равное распределение обоих аллелей в данной популяции и, следовательно, имеет вероятность 11,5-12,5% наличия другого (гомозиготного) гено-типа у двух особей этой популяции (например, донора и реципиента). Следовательно, набора из 30-35 SNPs достаточно, чтобы идентифицировать по меньшей мере 3 информативных однонуклеотидных полиморфизма для каждой пары донор-реципиент, которые можно использовать в дальнейшем анализе [5].

Для проведения генотипирования трёх реципиентов и соответствующих доноров с целью поиска таких SNP, по которым они имеют различные аллельные варианты в гомозиготном состоянии, были апробированы 30 вариантов SNPs, отобранных сотрудниками лаборатории фармакогеномики Института Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН г. Новосибирск. Цифровую ПЦР проводили с использованием системы QX100™ Droplet Digital PCR (Bio-Rad).

В ходе работы показано, что в первые дни после операции выявляются высокие значения как уровней dd-cfDNA, так и биохимических показателей (креатинин и с-реактивный белок). По прошествии недели после операции уровни оцениваемых показателей падают в среднем в 2-5 раз, к концу второй недели уровень dd-cfDNA снижается до минимальных значений, а уровень креатинина

достигает нормы. Значения уровня общей cfDNA также уменьшаются в течение периода наблюдения, что свидетельствует об общем состоянии организма и протекающих воспалительных процессах (табл).

ТАБЛИЦА. СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ CFDNA РЕЦИПИЕНТА И ДОНОРА, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВЫБРАННЫХ SNP; ДИНАМИКА КРЕАТИНИНА И С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА У ТРЕХ ПАЦИЕНТОВ

№ пациента	Дата забора образца	Кол-во дней после операции	SNP реципиента, копии/мкл	SNP донора, копии/мкл	Креатинин, мкмоль/л (58-96)	С-реактивный белок, мг/л (0-5)
6	14.12.2021	1	620,50	1,38	87,00	25,20
	16.12.2021	3	282,50	0,26	58,00	5,40
	20.12.2021	7	86,50	0,13	68,00	14,60
	22.12.2021	9	52,95	0,20	74,00	6,90
	27.12.2021	14	49,05	0,20	78,00	2,40
			SNP реципиента, копии/мкл	SNP донора, копии/мкл		
7	21.04.2021	4	35,00	0,48	261,00	5,50
	23.04.2021	6	27,70	0,29	140,00	2,60
	26.04.2021	9	53,50	0,44	89,00	1,30
	28.04.2021	11	51,70	0,36	95,00	2,80
	11.05.2021	24	10,50	0,29	108,00	0,50
	14.05.2021	27	15,40	0,20	99,00	0,30
	03.06.2021	46	41,20	0,17	113,00	0,30
			SNP реципиента, копии/мкл	SNP донора, копии/мкл		
8	22.10.2021	1	13,50	0,62	783	49,30
	27.10.2021	6	5,90	0,43	192	6,50
	08.11.2021	17	5,60	0,16	138	5,40
	10.11.2021	19	4,70	0,36	-	-
	12.11.2021	21	3,85	0,15	127	1,50
	15.11.2021	24	3,10	0,25	136	0,50

Выводы. Проведенное нами исследование показывает, что применение метода исследования бесклеточной ДНК и поиск фракций донора в крови реципиента является возможным и сопоставимым с результатами биохимических маркеров. В исследовании принимали участие пациенты со стабильным послеоперационным периодом, поэтому очевидно предполагать лишь дальнейшее снижение уровня dd-cfDNA.

Список литературы

1. Meier-Kriesche H. U. et al. Kidney Transplantation Halts Cardiovascular Disease Progression in Patients with End-Stage Renal Diseases // American Journal of Transplantation. — 2004. — Т. 4. — №. 10. — С. 1662-1668.
 2. Sigdel T. K. et al. A rapid noninvasive assay for the

detection of renal transplant injury // Transplantation. — 2013. — Т. 96. — №. 1. — С. 97-101.

3. Oellerich M. et al. Absolute quantification of donor-derived cell-free DNA as a marker of rejection and graft injury in kidney transplantation: Results from a prospective observational study // American journal of transplantation. — 2019. — Т. 19. — №. 11. — С. 3087-3099.

4. Knight S. R., Thorne A., Faro M. L. L. Donor-specific cell-free DNA as a biomarker in solid organ transplantation. A systematic review // Transplantation. — 2019. — Т. 103. — №. 2. — С. 273-283.

5. Beck J., Oellerich M., Schütz E. A universal droplet digital PCR approach for monitoring of graft health after transplantation using a preselected SNP set // Digital PCR: Methods and Protocols. — 2018. — С. 335-348.

Раздел 19. НОВЕЙШИЕ РАЗРАБОТКИ В ОБЛАСТИ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (NGS)

РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ ВИДОВОЙ КЛАССИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ УЧАСТКА ГЕНА 16S rRNA

Б.С. Гуков^{1,2}, А.Д. Мацвай¹, Г.А. Шипулин¹

¹ ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова (МГУ), Москва, Россия

Введение. Задача классификации состава бактериальных сообществ с точностью до вида становится все более актуальной для различных областей, от экологических исследований до клинической медицины. С развитием методов секвенирования, ученые получили мощный инструмент для глубокого изучения микробиома. Эти методы позволяют анализировать миллионы генетических последовательностей, выявляя и классифицируя различные виды бактерий, основываясь на их генетических маркерах, в качестве которых используется последовательность гена 16S rRNA. Современные платформы производят десятки миллионов прочтений, для анализа которых существует большое количество готовых программных решений, которые, тем не менее обладают рядом ограничений, основными из которых являются невозможность/ограниченность классификации данных частичного секвенирования гена 16S rRNA до уровня вида. Видовая идентификация патогена является первоочередной задачей в клинической диагностике бактериальных инфекций и обуславливает ограниченность применения данных методов в молекулярной диагностике.

Цель и задачи. Основной целью работы стала разработка алгоритма классификации данных частичного секвенирования гена 16S rRNA бактериальных сообществ до уровня вида и реализация его в виде программного обеспечения. Для возможности применения методов, основанных на локальных выравниваниях без значительных потерь в производительности, требовалась разработка алгоритма, включающего иерархическую кластеризацию прочтений и вычисление репрезентативных консенсусных последовательностей.

Материалы и методы. Для разработки программного обеспечения, в качестве основного языка программирования был использован Python 3.10. Программа использует следующие сторонние свободно распространяемые программы / библиотеки: NumPy, BioNumPy, NGmerge, kmerhash, UMAP, HDBSCAN, abPOA, Blastn.

Для тестирования и отладки программы была использована база данных GreenGenes 13_5 от 2019 года (БД). БД была отфильтрована так, чтобы каждая последовательность имела таксономию до вида. Кроме того, были убраны записи, содержащие sp., genotosp. и genosp. Была проведена фильтрация по длине последовательностей. Каждая последовательность в отфильтрованной БД имеет

длину не менее 1250 нуклеотидов. После были убраны последовательности, содержащие хотя бы одну вырожденную позицию. С использованием обработанной БД была произведена симуляция прочтений участка гена 16S rRNA для платформ Illumina (парно-концевое чтение со средним качеством секвенирования Q = 40) и платформ Oxford Nanopore (одноконцевое чтение со средним качеством секвенирования Q = 12).

Основные результаты. Разработанное программное обеспечение работает в интерфейсе командной строки и реализует полный цикл анализа данных секвенирования, начиная от сырых прочтений, заканчивая выдачей отчета о результатах исследования; осуществляет обработку как одноконцевых, так и парно-концевых прочтений; может быть также использована для анализа данных нанопорового секвенирования.

Программа реализует разработанный алгоритм таксономической классификации, начинающийся с кодирования каждого прочтения в одномерный вектор длины 46 частот 6-меров с последующим расчётом для каждой пары векторов расстояния по метрике Евклида. Полученная матрица подвергается нелинейному снижению размерности. Далее происходит иерархическая пространственная кластеризация на основе плотности проекции матрицы дистанций на двумерную плоскость. Для каждого выделенного кластера строится ациклический граф множественного выравнивания и, с использованием адаптивного динамического программирования, происходит построение консенсуса. Таким образом каждый консенсус становится репрезентативной последовательностью соответствующего кластера, который используется для классификации. По результатам классификации рассчитывается значение «уверенности» результата, как отношение количества присвоений данного консенсуса к конкретной таксономической группе к полному количеству находок для данного консенсуса. Еще одной отличительной особенностью разработанной программы является последующее аннотирование выявленных таксономических групп и автоматическое присвоение статуса патогенности для клинически значимых видов бактерий.

Тестирование разработанного программного обеспечения на симуляционном датасете включало 500 различных видов бактерий, относящихся к 276 родам, 136 семействам. Для данных, симулирующих парно-концевые прочтения

участка гена 16S rRNA на платформе Illumina, была получена верная классификация до уровня вида для 97.2% записей. Процент прочтений, неверно классифицированных на уровне порядка составил 0,95%, 0,22% прочтений были неверно классифицированы на уровне семейства и 1,57% на уровне вида. Для симуляционных данных нанопорового секвенирования верная классификация до уровня вида была получена для 99.6% записей. Все неверно классифицированные прочтения относились к роду *Sphingomonas*.

Заключение. Применение комплексного подхода к

решению задачи видовой классификации бактерий по результатам секвенирования 16S rРНК позволяет не только идентифицировать известные виды бактерий, но и открывает возможности для выявления новых, ранее неизвестных организмов.

В будущем предполагается дальнейшее совершенствование программы, учет новых методологических подходов, адаптация под узкоспециализированные задачи исследований, а также разработка пользовательского графического интерфейса для удобного использования программы.

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ СЛОЖНЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПЛАТФОРМЕ ILLUMINA MISEQ

Зяцьков А.А.¹, Шафорост А.С.¹, Баранов О.Ю.², Воропаев Е.В.¹

¹ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

² Национальная Академия наук Республики Беларусь, Минск, Беларусь

Актуальность. Микробиом оказывает значительное влияние на поддержание состояния физиологической нормы организма человека: бактерии способствуют формированию среды организма, принимают участие в регуляции сократительной активности кишечника, синтезе витаминов, нейроактивных соединений и незаменимых аминокислот, метаболизме жиров, поддержании иммунного гомеостаза за счет поддержания гуморального иммунитета и обучения эффекторов клеточного иммунитета и т.д. Одним из методов исследования микробиома является метагеномное секвенирование с помощью высокопроизводительных секвенаторов второго и третьего поколения.

Целью настоящей работы является рассмотрение особенностей пробоподготовки образцов с низким количеством бактериальной ДНК для метагеномного секвенирования на платформе Illumina MiSeq.

Методы. Для идентификации микроорганизмов на данной платформе используются короткие фрагменты регионов V3/V4 гена 16S бактерий.

Для сообществ с высоким альфа-разнообразием и большой концентрацией бактерий (например, кишечника) процесс пробоподготовки для метагеномного секвенирования не вызывает каких-либо затруднений. В случае работы с образцами из биотопов, которые характеризуются низким разнообразием и обилием микробиоты (биоптаты желудка, образцы мочи, околоплодных вод, асцитической жидкости и др.), а также большой долей ДНК человека, использование стандартного протокола пробоподготовки приводит к существенному снижению объема получаемых данных и возможному искажению информации о структуре исследуемого микробиома.

В этом случае необходимо проводить дополнительный этап для обогащения образца за счет ПЦР-амплификации с использованием праймеров, охватывающих регионы с V1 по V9 гена 16S бактерий (таблица 1) с последующей амплификацией целевого региона (16S V3/V4).

ТАБЛИЦА 1. СТРУКТУРА ПРАЙМЕРОВ И ОРИЕНТИРОВОЧНЫЙ РАЗМЕР АМПЛИКОНА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЯ ЦЕЛЕВОЙ ПЦР

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер, п.н.
16S_V1-V9-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	~ 900 п.н.
16S_V1-V9-R	CCGTCGAATCTTTRAGTTT	
16S_V3/V4-F	CGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	~ 550 п.н.
16S_V3/V4-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC	

Основанием для проведения процедуры обогащения является низкая концентрация ДНК после экстракции и отсутствие возможности получения дополнительного количества ДНК и ее концентрирования. В результате наблюдается увеличение количества матрицы для проведения целевой ПЦР регионов V3/V4 гена 16S бактерий, что мож-

но оценить путем сравнения концентраций ампликонов после целевой ПЦР с обогащением и без него.

Выводы. Использование обогащения образцов целевыми фрагментами позволяет проводить изучение структуры микробиома биоптатов и других образцов, содержащих следовые количества ДНК бактерий.

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБОГАЩЕНИЯ ЭКЗОМА ЧЕЛОВЕКА AGILENT ALL EXON V8 С НАБОРАМИ ОТ КИТАЙСКИХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ VAZYME И NANODIGMBIO

Белова В.А., Поникаровская Н.Г., Шмитко А.О., Самитова А.Ф., Козырева И.В., Репинская Ж.А., Василядис Ю. А., Ребриков Д.В., Коростин Д.О.

Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, Москва, Россия

Актуальность и цель: Экзомное секвенирование (WES) остается мощным инструментом в генетических исследованиях. В предыдущей работе мы провели сравнение протоколов обогащения зондами Agilent SureSelect Human All Exon v7 и v8, что позволило выявить преимущества последних. В этом исследовании мы продолжили анализ, сравнивая зонды последней версии Agilent SureSelect Human All Exon v8 с альтернативными решениями: Target Capture Core Exome Panel от компании Vazyme и Nexome Core Panel Plus от компании Nanodigmbio из КНР.

Материалы и методы: Для проведения сравнения мы провели обогащение пар пулов по 12 библиотек ДНК (всего 4 пула) с использованием зондов Agilent против Vazyme и Agilent против Nanodigmbio. Библиотеки для обогащений Agilent и Vazyme были сделаны набором MGI Universal DNA library prep set, библиотеки для обогащения Vazyme были сделаны набором VAHTS Universal Pro DNA Library Prep Kit for MGI, любезно предоставленным производителем для валидации. Обогащение пулов с зондами Agilent выполнялось по протоколу RSMU_exome, обогащения пулов Vazyme и Nanodigmbio — наборами, предоставленными производителями: VAHTS Target Capture Hybridization and Wash Kit и NadPrep Hybrid Capture Reagents. Секвенирование проводили в режиме PE100 на DNBSQ-G400. Всего получили 48 парных fastq файлов. Далее проводили нормализацию данных до одинакового количества ридов на образец (44,1М ридов по минимальному образцу) и биоинформатический анализ с помощью программ FastQC, Trimmomatic, BWA, Picard.

Результаты: Проведенный анализ данных выявил, что китайские зонды Vazyme и Nanodigmbio демонстриру-

ют сравнимую или даже более высокую эффективность по сравнению с зондами Agilent v8. Target size наборов между собой не сильно отличаются, для Agilent v8 равен 35,24 Мб, набора Vazyme — 33,9 Мб и набора Nanodigmbio — 34,5 Мб. Причем при одинаковом количестве ридов средняя величина покрытия таргета оказалась выше для обоих парных сравнений у китайских решений — 68,8х у Nanodigmbio против 60,4х у Agilent и 65х у Vazyme против 60,54х у Vazyme. Среднее значение on-target ридов для пула Nanodigmbio достигло максимального значения 91%, для остальных трех пулов было одинаковым — 88%. Важно отметить, что средняя полнота (ширина) покрытия таргета 10х оказалась даже выше для китайских зондов, Vazyme — 98,15% против парного пула Agilent — 96,17% и Nanodigmbio — 98,16% против парного пула Agilent — 96,74%. Стоит отметить, что зонды Agilent — это РНК-олигонуклеотиды длиной 120 о., а зонды Vazyme и Nanodigmbio — ДНК- олигонуклеотиды длиной 120 о., благодаря чему требования к транспортировке, хранению и работе с ними в лаборатории ниже.

Заключение: Традиционно оказывающиеся среди лидеров по качеству решения для WES от Agilent на сегодня не являются единственным эффективным вариантом для рутинной работы. Полученные результаты подтверждают, что альтернативные варианты наборов для обогащения также обладают высокой эффективностью, по некоторым параметрам превосходящей Agilent v8. Это открывает новые перспективы для выбора оптимальных процессов экзомного секвенирования в связи с большей доступностью китайских решений в РФ.

Работа поддержана Грантом № 075-15-2019-1789 Минобрнауки РФ.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ЭКЗОМА ЧЕЛОВЕКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРЕДИКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Глотов О.С.^{1,2}

¹ ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург;

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург

Разработка технологии секвенирования нового поколения привела к выявлению большого количества генетических маркеров и способствовала установлению причин ряда редких моногенных заболеваний, а также улучшению

профилактики и повышению эффективности лечения многофакторных заболеваний.

Цель настоящего исследования — на основании результатов экзомного секвенирования определить факто-

ры риска социально-значимых заболеваний и разработать методологические подходы для выявления клинически значимых генных вариантов с целью оценки риска развития моногенной, олигогенной и мультифакториальной патологии, тяжести протекания некоторых вирусных инфекционных заболеваний у человека на примере Северо-Западного региона России.

Представлены данные применения NGS для секвенирования ДНК пациентов с моногенными, олигогенными, мультифакториальными и инфекционными заболеваниями; получены новые данные о распространенности моногенных заболеваний; впервые описаны новые патогенные варианты; описаны клинические случаи нескольких наследственных заболеваний у одного человека; показано, что эффективность NGS увеличивает диагно-

стическую выявляемость; показана эффективность идентификации генов-кандидатов сахарного диабета 2 типа и ожирения, а также новой коронавирусной инфекции COVID-19 при помощи экзомного секвенирования и оригинальных биоинформационных подходов для небольших когорт больных; подчеркивается отсутствие четкой грани между моногенными, олигогенными и МФЗ.

Разработана концепция генетического клинического паспорта здоровья и новая методология определения генетических детерминант с последующей интерпретацией найденных вариантов, которая подтверждает клиническое значение генетических предикторов при формировании групп риска моногенных, мультифакториальных заболеваний и новой коронавирусной инфекции COVID-19.

ОБЗОР ПРОГРАММНЫХ РЕШЕНИЙ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ АДАПТЕРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И ТРИММИНГА ПРОЧТЕНИЙ ПРИ ОБРАБОТКЕ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Бобрик П.Ю.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минский р-н, д. Боровляны, Беларусь

Введение. Сегодня применение методов секвенирования нового поколения (NGS) в клинической диагностике позволяет детектировать различные виды мутаций, что особенно важно при определении типа заболевания и его генетической причины. Данная технология широко применяется в онкогематологических и иммунологических исследованиях. Так, например, с помощью NGS можно установить генетическую причину врожденных нарушений иммунитета у людей с гетерогенным клиническим фенотипом, когда заподозрить конкретный ген в патогенезе развития данных нарушений представляется затруднительным [1].

Актуальность. Обработка данных секвенирования нового поколения состоит из нескольких этапов, одним из которых является тримминг прочтений и удаление адаптерных последовательностей. Это довольно важный шаг, так как необработанные данные могут привести к ложным результатам. Актуальной задачей является поиск оптимального программного решения для обрезки чтений, предоставляющего функционал, необходимый для надёжной обработки данных секвенирования.

Цель и задачи. Цель работы — провести анализ имеющихся в свободном доступе программных решений для удаления адаптеров и тримминга прочтений. Были поставлены следующие задачи: рассчитать среднее время работы каждой программы, зафиксировать ключевые особенности.

Материалы и методы. Для тестирования были выбраны следующие программы: AlienTrimmer, BBDuk, Cutadapt, fastp, Trimmomatic. Данные инструменты имеют высокую популярность в научном сообществе, а также подробные пользовательские инструкции. На-

бор данных для тестирования состоял из 30 библиотек секвенирования. Автоматизация процесса тестирования осуществлялась с помощью пользовательского скрипта Python (v3.8).

Результаты. Результаты тестирования представлены в таблице 1. Кроссплатформенный триммер последовательностей Trimmomatic справлялся с поставленной задачей (удаление адаптерных последовательностей и глобальная обрезка чтений) в среднем за 40,66 секунд ($\pm 10,16$ сек.). Для удаления адаптеров программе требуется файл в формате fasta, в котором находятся подлежащие удалению последовательности. Trimmomatic способен обрабатывать сжатые fasta-файлы в формате gzip. Инструмент fastp обрабатывал данные в среднем за 21,5 секунду ($\pm 6,85$ сек.). Программа способна выполнять не только обрезку чтений и удаление адаптеров, но и давать качественную оценку данным секвенирования. Кроме того, fastp может самостоятельно определять и удалять адаптеры. Как и Trimmomatic, fastp способен работать со сжатыми файлами, а также поддерживает многопоточность. BBDuk является частью пакета BBTools. Программа производила тримминг и удаление адаптерных последовательностей в среднем за 22,25 секунды ($\pm 4,73$ сек.). BBDuk имеет широкий функционал, подробно описанный в руководстве пользователя [6]. Программе AlienTrimmer для работы потребовалось максимальное количество времени среди всех тестируемых программ — 264,10 секунды ($\pm 30,3$ сек.). Кроме того, AlienTrimmer не поддерживает функцию глобальной обрезки и обработку сжатых файлов. Однако стоит заметить, что для работы AlienTrimmer потребовался очень малый объём вычислительных ресурсов, что может быть важно при отсутствии

мощного оборудования. Cutadapt выполнял тримминг и удаление адаптерных последовательностей в среднем за 34,75 секунды ($\pm 9,35$ сек.). Инструмент поддерживает

многопоточность, а также имеет максимально разнообразный функционал по удалению адаптерных последовательностей.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОГРАММ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ АДАПТЕРОВ И ТРИММИНГА ПРОЧТЕНИЙ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Название программы	Среднее время работы (сек.)	Функция глобальной обрезки	Возможность удаления адаптеров	Автоопределение адаптеров	Версия
Trimmomatic ^[2]	40,66 \pm 10,16	+	+	–	v0.39
fastp ^[3]	21,5 \pm 6,85	+	+	+	v0.23.4
BBDuk	22,25 \pm 4,73	+	+	–	v39.01
AlienTrimmer ^[4]	264,10 \pm 30,3	–	+	–	v0.4.0
Cutadapt ^[5]	34,75 \pm 9,35	+	+	–	v4.4

Заключение. Таким образом, можно заключить, что на данный момент существует достаточное количество программных решений, выполняющих удаление адаптеров и тримминг сырых прочтений. Выбор конкретного инструмента должен зависеть от поставленных целей и программного окружения. Среди рассмотренных

программных решений выделяется fastp, так как кроме максимальной скорости работы, возможности автоопределения адаптеров и поддержки многопоточности, программа способна генерировать отчёт о качестве чтений, что делает fastp оптимальным вариантом для обработки данных NGS.

АНАЛИЗ ГЕНОМОВ И УСТАНОВЛЕНИЕ ТОКСИГЕННОГО ПРОФИЛЯ БАКТЕРИЙ РОДА *VACILLUS*

Поляков Н.Б.^{1,2}, Карпов Д.С.³, Ковалев М.А.³, Щербинин Д.Н.¹, Соловьев А.И.¹, Зубашева М.В.¹, Смирнова Т.А.¹, Сухина М.А.⁴, Жуховицкий В.Г.^{1,5}

¹ ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУН «Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского» Российской академии наук, Москва, Россия

³ ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А. Н. Рыжих» Минздрава России, Москва, Россия

⁵ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного образования» (РМАНПО) Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Бактерии рода *Vacillus* — факультативно анаэробные грамположительные спорообразующие токсигенные бактерии, широко распространённые в окружающей среде (почва, растения). Наиболее часто *Vacillus cereus* вызывают у человека заболевания желудочно-кишечного тракта, однако в последние годы были описаны случаи развития тяжёлых форм пневмонии, менингита, поражения глаз и сепсиса у больных с ослабленным иммунитетом в результате инфицирования *V. cereus*.

Цель работы. Секвенирование, анализ геномов, выявление факторов патогенности референсных штаммов *V. cereus* и клинических изолятов *V. cereus* и *V. cytotoxicus*, выделенных из просветных фекалий больных язвенным колитом (ЯК).

Материалы и методы. В работе использовали коллекционные штаммы *V. cereus* (ATCC 10876, ATCC 10702), а также клинические изоляты (*V. cereus* CCGC 1208, *V.*

cytotoxicus CCGC 19/16), полученные из ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А. Н. Рыжих» Минздрава России. Геномы бактериальных штаммов секвенировали в ЦКП «Геном» (ИМБ РАН). ДНК библиотеки для секвенирования готовили из очищенной геномной ДНК бактерий с помощью набора Nextera DNA Flex Library Prep (Illumina, США). Качество библиотек контролировали с помощью биоанализатора Agilent 2100. Библиотеки секвенировали на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора MiSeq Reagent Micro Kit v2 (Illumina, США). Первичный анализ прочтений проводили с помощью программного обеспечения Illumina (<https://basespace.illumina.com/dashboard>). Черновые геномы собирали с помощью программы Velvet (версия 1.0.0) (<https://basespace.illumina.com/apps/8556549/Velvet-de-novo-Assembly?preferredversion>) с параметрами по умолчанию. Качество сборки геномов

оценивали с помощью программы BUSCO (версия 5.4.6). Поиск последовательностей 16S PHK осуществляли с помощью сервера MiGA Online (<http://microbial-genomes.org/>). Аннотация генов выполнены с помощью сервера MiGA Online. Поиск генов устойчивости к антибиотикам проводили с помощью базы данных CARD (<https://card.mcmaster.ca/>). Поиск генов вирулентности проводили в базе данных BV-BRC (<https://www.bv-brc.org/>). Поиск

токсинов был выполнен с помощью базы данных DBETH (<http://www.hpppi.iicb.res.in/btox/>).

Результаты. Секвенированы геномы трех штаммов *B. cereus* (ATCC 10876, ATCC 10702, CCGC 1208/16) и одного штамма *B. cytotoxicus* (CCGC 19/16) на платформе Illumina MiSeq (США). В ходе анализа собранных геномов установлен токсигенный профиль исследованных штаммов *B. cereus* и *B. cytotoxicus* (таблица).

ТАБЛИЦА. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМОВ И ДЕТЕРМИНАНТ ПАТОГЕННОСТИ ИССЛЕДОВАННЫХ ШТАММОВ *B. CEREUS* И *B. CYTOTOXICUS*

Характеристика	Штаммы <i>Bacillus</i>			
	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	CCGC 1208/16	<i>B. cytotoxicus</i> CCGC 19/16
Источник	Референсный штамм	Референсный штамм	Просветные фекалии (ЯК)	Просветные фекалии (ЯК)
Хромосома	5 299 680 п.н.	5 442 550 п.н.	5 114 845 п.н.	4 231 565 п.н.
Плазмиды	1 596 п.н. 1 615 п.н. 2 185 п.н. 2 953 п.н.	Н.о.	1 596 п.н. 1 615 п.н. 2 185 п.н. 2 953 п.н.	Н.о.
Гены, кодирующие белки	5 671	5 977	5 794	4 718
Негемолитический энтеротоксин NHE (<i>nhe</i>)	<i>nheA</i> <i>nheB</i> <i>nheC</i>	<i>nheA</i> <i>nheB</i> <i>nheC</i>	<i>nheA</i> <i>nheB</i> <i>nheC</i>	<i>nheA</i> <i>nheB</i> <i>nheC</i>
Гемолизин BL (<i>hbl</i>)	— — — —	<i>hblA</i> <i>hblB</i> <i>hblC</i> <i>hblD</i>	— — — —	— — — —
Энтеротоксин T (<i>bceT</i>)	—	—	<i>bceT</i>	—
Энтеротоксин FM (<i>entFM</i>)	<i>entFM</i>	<i>entFM</i>	<i>entFM</i>	<i>entFM</i>
Цитотоксин K (<i>cytK</i>)	—	<i>cytK</i>	<i>cytK</i>	<i>cytK</i>
Цереулид (<i>ces</i>)	—	—	—	—
Фосфолипаза (<i>pc-plc</i>)	<i>pc-plc</i>	<i>pc-plc</i>	<i>pc-plc</i>	<i>pc-plc</i>
Сфингомиелиназа (<i>sph</i>)	—	<i>sph</i>	<i>sph</i>	—
Гемолизин III (D) (<i>ypIQ</i>)	<i>ypIQ</i>	<i>ypIQ</i>	<i>ypIQ</i>	<i>ypIQ</i>
Резистентность к антибиотикам	<i>fosA</i> , <i>mdeA</i> , <i>bcl</i> , <i>bclI</i> , <i>tetB(P)</i> , <i>qacJ</i>	<i>fosB</i> , <i>tetB(45)</i> , <i>bcl</i> , <i>bclI</i> , <i>bclIII</i> , <i>qacJ</i>	<i>fosB</i> , <i>tetB(P)</i> , <i>mdeA</i> , <i>bcl</i> , <i>bclI</i> , <i>qacJ</i>	<i>fosB</i> , <i>qacG</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> ,

По данным полногеномного секвенирования NGS у исследованных штаммов были обнаружены гены четырех различных типов диарейных энтеротоксинов: гены термолabileного энтеротоксина —гемолизина HBL (*hblA*, *hblB*, *hblC*, *hblD*); гены негемолитического энтеротоксина NHE (*nheA*, *nheB*, *nheC*); гены термолabileного энтеротоксина T (*bceT*); гены термостабильного энтеротоксина FM (*entFM*); гены термостабильного цитотоксина K (*cytK*). Кроме того, были обнаружены гены фосфолипазы (*pc-plc*), сфингомиелиназы (*sph*), гемолизина III (D) (*ypIQ*), а также гены, участвующие в множественной лекарственной устойчивости:

гены устойчивости к фосфомицину (*fosA*, *fosB*), тетрациклину (*tetB(45)*, *tetB(P)*), фторхинолонам (*gyrA*, *gyrB*, *mdeA*), четвертичным соединениям аммония (*qacJ*, *qacG*), гены устойчивости к бета-лактамам (*bcl*, *bclI*), гены металло-бета-лактамазы (*bclIII*).

Выводы. Как референсные, так и свежeweыделенные штаммы рода *Bacillus*, обладают широким набором генов диарейных энтеротоксинов и генов антибиотикорезистентности. Полученные данные могут быть использованы при разработке тест-систем для выявления энтеротоксинов *B. cereus* и *B. cytotoxicus* в объектах различной природы.

КОМПЬЮТЕРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ГЕННОЙ СЕТИ МЕЛАНОМЫ С ПОМОЩЬЮ УТИЛИТЫ SHOWGENE

Холодкова Е.И.¹, Волков И.А.¹, Савина Е.А.^{1,2}, Орлов Ю.Л.¹

¹ Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия

Актуальность. Разработка инструментов для построения генных сетей является важным аспектом изучения молекулярных механизмов различных онкологических заболеваний. В данной работе рассматривается применение инструментов визуализации генной сети, реконструированной по заданному списку генов, с помощью интеграции доступных онлайн-инструментов и собственной программной утилиты на примере меланомы.

Меланома представляет собой тип злокачественной опухоли, развивающейся из меланоцитов, клеток, отвечающих за производство пигмента меланина. Актуальность проблемы меланомы в современном мире нельзя недооценивать [1]. За последние десятилетия заболеваемость меланомой значительно увеличилась, и она стала одной из самых быстрорастущих форм рака. Причиной этого могут быть различные факторы, включая увеличение уровня ультрафиолетового излучения от солнца и использование соляриев [1].

Меланома имеет потенциально серьезные последствия, поскольку может метастазировать и распространяться на другие органы. При раннем обнаружении и лечении, шансы на полное излечение значительно возрастают. Принятие мер для предотвращения меланомы включает соблюдение солнцезащитных мер и регулярный осмотр кожи с целью выявления изменений, таких как новые родинки, изменение размера, формы или цвета существующих родинок.

Цель. Для более полного понимания развития и прогрессии меланомы необходимо исследование генетических аспектов этого заболевания. Генные онтологии меланомы связаны с наследственными мутациями в генах, контролирующим рост и деление клеток. Некоторые генетические изменения, связанные с меланомой, включают мутации в генах BRAF, NRAS и CDKN2A, которые могут быть ответственными за ненормальное функционирование клеток меланомы [2].

Для более эффективного исследования генетических аспектов меланомы и построения генных сетей исследователи обращаются к биоинформационному анализу и использованию баз данных [3]. Комбинирование биоинформационных методов в изучении меланомы способствует лучшему пониманию ее биологических основ и помогает исследователям и клиницистам принимать более информированные решения о диагностике, прогнозировании и лечении.

Методы. Использовались открытые базы данных биоинформатики и разработка собственного программного инструмента. Разработка компьютерных программ и адаптация для решения задач биомедицины и биоинформатики, связанными с моделями онкологических и комплексных наследственных заболеваний, выполнялась студентами во время обучения и выполнения дипломных

работ на Цифровой Кафедре Сеченовского Университета в 2022-2023 годах (<https://dk.sechenov.ru/>).

Работа выполнена с использованием баз данных NCBI и STRING-DB, библиотек: requests (<https://requests.readthedocs.io/>), time (<https://docs.python.org/3/library/time.html>), pandas (<https://pandas.pydata.org/>), matplotlib (<https://matplotlib.org/>), network (<https://networkx.org/>). Отметим, что методически возможно использование дополнительных баз данных, которые содержат информацию о белок-белковых взаимодействиях и позволяют построить граф взаимодействий генов и других макромолекул — BioGRID (Biological General Repository for Interaction Datasets), MINT (Molecular INTERaction database) и STRING-DB (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) (<https://string-db.org/>). В разработанном коде на язык программирования Python использовался публичный API платформы STRING.

Результаты. Построение генных сетей на основе базы данных STRING-DB позволяет строить интерактивную картину (визуализацию) графа сети взаимодействий, анализировать взаимодействия между генами и белками, связанными с меланомой. Разработан код для визуализации генной сети, показана его эффективность для списка из 250 генов, связанных с развитием меланомы. На основе базы STRING-DB создан удобный инструмент Showgene для работы через Python код.

В ходе работы выявлен ряд алгоритмических проблем и предложено их техническое решение. Организация генных сетей основывается на таких принципах, как наличие центральных генов, регуляторные контуры, мотивы и иерархическая структура. Проблема наложения при визуализации большого количества генов может возникнуть из-за ограничений пространства на графике и недостаточного учета размеров и расположения узлов. В разработанном коде используется `spring_layout` из библиотеки `networkx` для определения позиций узлов графа. Однако этот алгоритм раскладки может не всегда эффективно располагать узлы на графике, особенно при большом количестве узлов. Один из способов улучшить визуализацию и избежать наложения при большом количестве генов — выбор подходящего алгоритма раскладки графа, который учитывает плотность и структуру сети. Например, можно использовать алгоритм `force-directed layout`, который распределяет узлы на основе силы отталкивания и притяжения между ними. Кроме того, можно рассмотреть различные параметры визуализации, такие как размер узлов, ширина линий и цветовая схема, чтобы лучше отобразить информацию о генах и их взаимодействиях.

Выводы. Реконструкция генной сети позволяет выявить ключевые генетические маркеры, сигнальные пути и биологические процессы, которые играют роль в разви-

тии и прогрессии меланомы, помочь идентифицировать новые потенциальные мишени для лечения. Технической проблемой являются интеграция данных по структурам сети в форме графа и компьютерная визуализация.

Разработанная утилита Showgene для построения генных сетей на основе базы данных STRING-DB представляет значимый вклад в исследования молекулярных механизмов различных комплексных заболеваний, включая меланому. Утилита Showgene предоставляет пользователю удобный интерфейс для работы с базой данных STRING и проведения анализа генных сетей, специфичных для меланомы. Утилита полезна для разработчиков биоинформационного программного обеспечения и всех, кто интересуется генетическими аспектами онкологических заболеваний.

Литература

1. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014;28(6):1005-11.
2. Newell F, Johansson PA, Wilmott JS, Nones K, Lakis V, Pritchard AL et al. Comparative Genomics Provides Etiologic and Biological Insight into Melanoma Subtypes. *Cancer Discov*. 2022;12(12):2856-2879. doi: 10.1158/2159-8290.CD-22-0603
3. Zakharova G, Modestov A, Pugacheva P, Mekic R, Savina E, Guryanova A et al. Distinct Traits of Structural and Regulatory Evolutionary Conservation of Human Genes with Specific Focus on Major Cancer Molecular Pathways. *Cells* 2023; 12:1299. doi: 3390/cells12091299

РАЗРАБОТКА МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОЛИГЕННЫХ РИСКОВ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОМА С НИЗКИМ ПОКРЫТИЕМ

Апалько С.В.^{1,2}, Ностаева А.В.¹, Шиманский В.С.^{1,2}, Полковникова И.А.^{1,2}, Сушенцева Н.Н.¹, Анисенкова А.Ю.^{1,2}, Мосенко С.В.^{1,2}, Щербак С.Г.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница №40 Курортного района», Сестрорецк;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург.

Введение. Течение COVID-19 у пациентов варьируется от бессимптомного до тяжелого и крайне тяжелого, что может быть обусловлено генетической изменчивостью. Поскольку ранее опубликованные исследования показали, что восприимчивость и тяжесть COVID-19 имеют полигенную основу, можно предположить, что оценка полигенного риска (ОПР) может облегчить выявление людей с высоким риском тяжелого течения заболевания. За счет стратификации риска можно скорректировать план лечения пациентов на ранней стадии заболевания, не дожидаясь явных признаков ухудшения состояния.

Цель и задачи. Используя клинические данные пациентов, а также результаты полногеномного исследования ассоциаций (ПГИА) из консорциума COVID-19 host genetics initiative, ставилась задача построения полигенной модели с последующим анализом ее применимости для пациентов из российской популяции. Основной целью данной задачи являлась оценка производительности предсказательной модели, включающей в себя предиктор ОПР.

Материалы и методы. В рамках исследования COVID-19 был проведен сбор биоматериала (кровь) и клинических данных пациентов с COVID-19, госпитализированных в инфекционное отделение Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Городская больница №40 Курортного района».

Всего было собрано 5,398 образцов биоматериала, из них было секвенировано 1,348 образцов, разделенных на 50 групп. Секвенирование с низким покрытием было проведено на приборе MGISEQ-2000 (BGI, Китай) с использованием реагентов MGIEasy FS DNA Library Prep Set (MGI) на ячейке DNBSEQ-G400 High-throughput Sequencing Set (PE150, 540 Гб) (MGI). Для прочтений, полученных в резуль-

тате секвенирования, были проведены: анализ качества (FastQC), выравнивание (BWA), дедупликация (samtools) и коллинг вариантов (bcftools). Далее, для обеспечения высокой точности обнаружения вариантов при низком покрытии последовательностей был использован алгоритм импутации GLIMPSE. В качестве референсной выборки была использована панель 1000 Genomes. Для построения моделей ОПР были использованы данные 658 образцов. Разделение по тяжести течения было проведено по следующим критериям: в группу случаев вошли образцы от 204 пациентов (129 мужчин и 75 женщин, 63±14 лет) с поражением легких более 50% (КТ-3 и КТ-4), в контрольную группу — образцы от 454 пациентов (237 мужчин и 217 женщин, 57±15 лет). Для построения моделей полигенных рисков использовался байесовский подход SBayesR, реализованный в программном обеспечении GCTB, и данные консорциума COVID-19 Host Genetics Initiative.

Основные результаты. В результате секвенирования глубина покрытия прочтениями составила от 1 до 5, среднее значение — 3. В результате использования метода SBayesR была построена модель полигенных рисков на основе суммарных статистик из консорциума COVID-19 Host Genetics Initiative, предоставляющий в свободном доступе результаты метаанализа ПГИА, в котором были сведены вместе результаты 60 отдельных исследований из 25 стран. Данная модель представляет собой набор переоцененных эффектов однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), позволяющих рассчитать ОПР для предрасположенности к тяжелому течению COVID-19. Число ОНП, вошедших в модель, составляло 1,092,235. Из представленных в модели ОНП в среднем 95% присутствовали в полученных данных. Для каждого из 658 образцов

было посчитано значение ОНР как сумма генотипов, представленных в модели, взвешенная на размеры переоцененных эффектов ОНР. Таким образом, для групп случаев и контролей были получены векторы значений ОНР, которые использовались для дальнейшего сравнения распределения ОНР между этими группами и построения моделей логистической регрессии. Сравнение средних значений ОНР для групп случаев и контролей, выполненное с помощью t-критерия Стьюдента для двух

независимых выборок, показало значимые различия. Для групп, разделенных по тяжести течения, значение p-value было равно $1.7e-06$. Используя описанный выше сценарий разбиения образцов на группы случаев и контролей, далее были получены модели логистической регрессии с разным набором предикторов: 1) только ОНР; 2) только пол и возраст; 3) пол, возраст и ОНР. Результаты сравнения производительности трех моделей логистической регрессии, представлены в Таблице 1.

ТАБЛИЦА 1: РЕЗУЛЬТАТЫ КАЧЕСТВА ПРЕДСКАЗАНИЯ ЛОГИСТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ.

Модель	AUC для разделения по тяжести течения
ОНР	0.62 (95% ДИ: 0.57-0.66)
пол и возраст	0.65 (95% ДИ: 0.60-0.70)
пол, возраст и ОНР	0.67 (95% ДИ: 0.63-0.72)

* AUC — Area Under Curve, площадь под кривой; ДИ — доверительный интервал.

Также, мы разделили исследуемую выборку по полу и оценили качество предсказания логистических моделей отдельно для мужчин и женщин. Результаты показали, что в группе мужчин параметр ОНР предсказывает тяжелое течение заболевания с более высоким качеством, чем в группе женщин (AUC=0.66 [95% ДИ: 0.60-0.72] и AUC=0.56 [95% ДИ: 0.48-0.64], соответственно). При этом модель предсказания только по возрасту имеет примерно одинаковое качество для мужчин и женщин (AUC=0.63 [95% ДИ: 0.57-0.69] и AUC=0.62 [95% ДИ: 0.55-0.70], соответственно). Далее, было подсчитано отношение шансов (ОШ) на смертельный исход между группой с самыми высокими значениями ОНР (10%) и всеми остальными. Результаты показали, что $ОШ = 2.05$ с $p\text{-value} = 0.026$. Таким образом, в группе с самыми высокими значениями ОНР вероятность смертельного исхода при тяжелом течении заболевания значительно выше. Далее, анализ выживаемости, выполненный с помощью метода Каплана–Мейера, показал, что средний

риск тяжелого течения, который достигается в возрасте 60 лет, в группе с самыми высокими ОНР (10%) достигается уже в 45 лет.

Выводы. Результаты показывают, что средние значения распределения ОНР в группах случаев и контролей в задаче исследования предрасположенности к тяжелому течению COVID-19 значительно отличаются. Из этого можно сделать вывод, что ОНР позволяет стратифицировать людей в соответствии с генетической предрасположенностью к тяжелому течению COVID-19. В дальнейшем предполагается увеличение размера исследуемой выборки, что позволит улучшить мощность анализа. В целом расчет ОНР и последующее их сравнение продемонстрировали возможность использования моделей полигенных рисков, построенных на основе суммарных статистик (результаты ПГИА) из открытых данных с получением значимых результатов.

Исследование выполнено в рамках проекта Санкт-Петербургского государственного университета ID 94029859

ВОЗМОЖНОСТИ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО МЕДИЦИНСКОГО СОПРОВОЖДЕНИЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ СПОРТСМЕНОВ С УЧЕТОМ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Жолинский А.В.¹, Кадыкова А.И.¹, Деев Р.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр спортивной медицины и реабилитации Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Спортивная геномика относительно молодое направление медицины в профессиональном спорте, основные задачи которого это поиск генетических факторов в формировании физических качеств, молекулярных маркеров, ассоциированных с предрасположенностью к заболеваниям и травмам, возникающими под действием

интенсивных нагрузок, а также изучение особенностей метаболизма нутриентов и ксенобиотиков. Всестороннее исследование спортсмена, включая его геном, позволяет персонализировать тренировочный процесс и медицинское сопровождение, направленное на предупреждение различных патологических состояний, в том числе жизне-

угрожающих. К таким состояниям относят наследственные каналопатии, которые потенциально могут приводить к внезапной остановке сердца во время тренировочно-соревновательной деятельности.

Цель исследования — предупредить развитие наследственных заболеваний с преимущественным поражением миокарда с риском внезапной смерти у профессиональных атлетов. Основные задачи исследования-переход к персонализированному медико-биологическому обеспечению спортсменов и создание диагностической кардиогенетической панели для высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы. Для пилотного исследования были отобраны три спортсмена сборных команд России без патологических изменений сердечно-сосудистой системы по данным углубленного медицинского обследования (УМО), т.е. атлеты были фенотип-отрицательными. От них было получено добровольное информированное согласие на проведение одномоментного исследования. Источником ДНК послужила венозная кровь, ее экстрагировали набором DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителя. Концентрация ДНК определяли набором Qubit dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher, США). Качество выделенной ДНК было определено методом капиллярного гель-электрофореза на приборе Agilent Bioanalyzer (Agilent, США). Целевое обогащение экзомной ДНК проводили с использованием наборов Roche Hyper Exome. Библиотеки были отсеквенированы на приборе MGISEQ-2000 с величиной среднего покрытия 100X. Поиск патогенных и вероятно патогенных вариантов осуществлялся в 277 генах, ассоциированных с развитием заболеваний сердца с высоким риском внезапной смерти.

Основные результаты. У одного спортсмена обнаружен вероятно-патогенный вариант в гене *TRPM4* (с.А1678Т;р.К560Х, NM_001321285), приводящий к разви-

тию прогрессирующей семейной блокаде сердца, типа IV (OMIM: 618531). Ген *TRPM4* кодирует белок из семейства неселективных ионных каналов с транзитным рецепторным потенциалом, опосредует транспорт одновалентных катионов и отвечает за регуляцию деполяризации мембраны, предотвращая нарушения сердечной проводимости. Пенетрантность гена не известна, так как в литературе не описаны семьи с подобным изменением в экзоне. Поскольку атлет не заявлял желания не знать результаты высокопроизводительного секвенирования, ему было рекомендовано дополнительное кардиологическое обследование и динамическое наблюдение. В двух других образцах на момент исследования патогенных и вероятно-патогенных вариантов, ассоциированных с развитием заболеваний с риском внезапной смерти не обнаружено.

Выводы. На первом этапе анализа геномных данных спортсменов, были изучены гены, связанные с развитием заболеваний, приводящим к неблагоприятным исходам, в том числе к внезапной смерти. Несмотря на малое количество исследуемых, был обнаружен вероятно-патогенный вариант у фенотип-отрицательного спортсмена, что свидетельствует о важности кардиогенетического профилактического анализа. Обнаруженный вариант позволяет назначить дополнительные исследования атлету и изменить кратность прохождения УМО, такие действия делают подход более персонализированным, а унифицированным.

Благодарности. Исследование проведено на основании выполнения Государственного задания: «Изучение генетических маркеров, лимитирующих и определяющих успешность соревновательной деятельности, профилактика нежелательных последствий такой деятельности для жизни и здоровья спортсменов» (шифр: «МГИ-22»). Регистрационный номер НИОКТР: 122032300491-3.

Раздел 20. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

СИСТЕМА ШИРОКОГО СКРИНИНГА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (NGS)

Д.А. Григорян¹, И.Ф. Стеценко¹, А.Д. Мацвай¹, Г.А. Шипулин¹

¹ ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Введение. Наиболее распространенной группой вирусных заболеваний во всем мире являются острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), которые представляют собой основную причину сезонных вспышек заболеваемости. К инфекционным агентам, вызывающим респираторные заболевания, относятся такие вирусы, как респираторно-синцитиальные вирусы, коронавирусы, вирусы гриппа, вирусы парагриппа, аденовирусы, энтеровирусы, парэховирусы, бокавирусы и другие. В последние годы наблюдается рост случаев инфекционных заболеваний неустановленной этиологии и регистрируются вспышки новых инфекционных заболеваний, переходящие в эпидемии и пандемии. Контроль и оценка путей распространения известных патогенов и выявление новых видов патогенных микроорганизмов позволит своевременно реагировать на вновь возникающие угрозы, прогнозировать и выявлять вспышки вирусных заболеваний.

Нами разработан новый подход к созданию мультипраймерных панелей, предназначенных для проведения обширного скрининга вирусных инфекций, вызывающих заболевания человека. Данный подход был использован для разработки системы скрининга группы возбудителей инфекций, вызывающих заболевания органов дыхательной системы.

Цель исследования. Разработка и исследование аналитических характеристик скрининговой тест-системы, основанной на применении мультиплексной панели олигонуклеотидов для обогащения участков геномов вирусных патогенов, вызывающих симптомы респираторных заболеваний, с последующим высокопроизводительным секвенированием.

Материалы и методы. Дизайн первичных структур библиотек олигонуклеотидов для обогащения целевых локусов широкого спектра возбудителей респираторных заболеваний был реализован с применением разработанного нами программного обеспечения, алгоритм работы которого основан на высокоэффективных методах расчета систем праймеров с использованием матричных представлений, реализованных на графических ускорителях, что позволяет работать с базами данных, содержащими большое количество гетерогенных последовательностей. Для исследования аналитических характеристик скрининговой тест-системы

применялся контрольный материал, содержащий нуклеиновые кислоты 24 различных видов вирусных патогенов, вызывающих ОРВИ. В ходе таргетной амплификации с применением целевой пары праймеров из панели олигонуклеотидов был получен продукт для каждого вида вирусов с дальнейшей оценкой числа копий целевого ампликона в каждом контрольном образце с применением капиллярного электрофореза на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer. После чего, с использованием биологического материала человека (ротоглоточного мазка) была подготовлена серия 10-кратных разведений с копийностью $5 \cdot 10^3$ – $5 \cdot 10^7$ копий/мл. Для всех разведений исследование было проведено с применением тестируемой мультиплексной праймерной панели. Для амплификации на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific), поддерживающем регистрацию сигнала флуоресценции в режиме реального времени по каналу Green (FAM), была использована термостабильная TaqF-полимераза с «горячим стартом». После очистки амплификатов магнитными частицами Кара PureBeads проводилась пробоподготовка библиотек для высокопроизводительного секвенирования, которая включала в себя фосфорилирование 5'-ОН конца двухцепочечных ДНК-фрагментов с применением фермента полинуклеотидкиназы, лигирование универсальных Y-образных адаптеров и последующее присоединение каждой библиотеке уникальной комбинации индексов посредством ПЦР с праймерами, содержащими последовательность баркода. Далее в ходе высокопроизводительного секвенирования на платформе MiSeq (Illumina) были получены парноконцевые прочтения длиной 250 п.о.

Результаты. Разработанная мультиплексная панель олигонуклеотидов, состоящая из 78 вырожденных структур, позволяет выявить следующие семейства вирусов: *Enterovirus*, *Betapolyomavirus*, *Bocaparvovirus*, *Betacoronavirus*, *Alphacoronavirus*, *Mastadenovirus*, *Metapneumovirus*, *Orthopneumovirus*, *Parechovirus*, *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Morbillivirus*, *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*. На основании анализа данных высокопроизводительного секвенирования, обработанных алгоритмом для таксономической идентификации прочтений, была определена аналитическая чувствительность исследования с применением данной библиотеки олигонуклеотидов для 24 видов вирусов, вызывающих острые

респираторные инфекции. Для видов *Human polyomavirus 3*, *Human parechovirus A*, *Human orthopneumovirus*, *Influenza A virus*, *Human mastadenovirus B*, *Human coronavirus HKU1*, *Human rhinovirus A*, *Human rubulavirus 2* и *Human rubulavirus 4* аналитическая чувствительность в биологическом образце составляет $5 \cdot 10^4$ копий/мл.

Для видов *Enterovirus A*, *Enterovirus B*, *Enterovirus C*, *Human rhinovirus B*, *Human rhinovirus C*, *Human metapneumovirus*, *Human bocavirus*, *Influenza B virus*, *Human respirovirus 1*, *Human coronavirus NL63* уровень чувствительности детекции тест-системой составляет $5 \cdot 10^5$ копий/мл. Наименьший уровень аналитической чувствительности исследования был определен для *Human mastadenovirus C* — $5 \cdot 10^6$ копий /мл и для *Human coronavirus 229E* — $5 \cdot 10^7$ копий /мл.

Наилучший показатель аналитической чувствитель-

ности исследования ($5 \cdot 10^3$ копий/мл) был установлен для одних из самых распространенных возбудителей вирусных респираторных инфекции — *SARS-CoV-2*, *Human respirovirus 3* и *Measles morbillivirus*.

Заключение. Нами разработана скрининговая тест-система, основанная на применении мультиплексной панели олигонуклеотидов для обогащения фрагментов геномов инфекционных агентов, вызывающих острые респираторные заболевания. Праймерная панель состоит из 78 вырожденных структур и обеспечивает расчетное покрытие 99,81% геномных последовательностей референсной базы данных. На основании полученных данных исследования установлена аналитическая чувствительность разработанной скрининговой тест-системы, составляющая $5 \cdot 10^3$ копий/мл — $5 \cdot 10^7$ копий/мл.

АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА НЕЙРАМИНИДАЗЫ ПОДТИПА N9

Копылова Н.В.¹, Дешева Ю.А.²

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия (СПбГУ)

²ФГБНУ Институт экспериментальной медицины (ИЭМ), Санкт-Петербург, Россия

Для вирусов гриппа А характерна высокая изменчивость и способность уклоняться от существующего иммунитета. В результате антигенного дрейфа возникают и накапливаются мутации в вирусных гликопротеинах, которые постепенно изменяют их антигенность, в связи с чем периодически появляются пандемически опасные вирусы ранее не циркулировавших среди людей подтипов. Так, в 2013 году в Китае был идентифицирован реассортантный низкопатогенный вирус птичьего гриппа H7N9, который в последующем неоднократно приводил к инфицированию людей. Несмотря на значительное уменьшение числа заболеваний среди людей, после проведения в 2016 году комплексной вакцинации домашней птицы, вирус H7N9 продолжает циркулировать и претерпевать интенсивную эволюцию, представляя опасность для человека. Частый антигенный дрейф способствует увеличению разнообразия среди вирусов и появлению новых генотипов с измененными антигенными свойствами, которые могут ускользнуть от приобретенного иммунитета хозяина. При этом, многое известно об эволюционной изменчивости гемагглютинина (HA) вирусов A/H7N9, тогда как об антигенном дрейфе нейраминидазы (NA) меньше данных. В связи с этим, возникает необходимость в отслеживании изменений в антигенных структурах с целью контроля распространения вируса A/H7N9 путем создания и обновления коллекций соответствующих вакцинных штаммов в случае угрозы пандемии, а также для лучшего понимания механизмов адаптации и возникновения ускользающих мутантов.

Цель исследования. Изучить и сравнить антигенные свойства NA вирусов A/H7N9, выделенных до и после 2016 года.

Задачи:

1) Провести молекулярно-генетический анализ вирусов A/H7N9, выделенных за период 2013-2017 гг.

2) Выполнить анализ ферментативной активности NA вирусов A/H7N9.

3) На мышах изучить защитный эффект моноклональных антител к N9-13 против инфекции вирусом A/H7N9-17.

Материалы и методы. Для проведения эволюционного анализа использовались аминокислотные и нуклеотидные последовательности нейраминидазы вирусов H7N9, взятые из GenBank, а также эскейп-мутанты вируса H7N9-2017, полученные в ФГБНУ «ИЭМ» методом предельных разведений. Для изучения и сравнения антигенных свойств нейраминидазы вирусов использовались вакцинные штаммы A/17/Anhui/2013/61(H7N9) и A/Hong Kong/125/2017 IDCCD-RG56B. Также в работе были использованы три моноклональных антитела с высокой аффинностью связывания с белком N9 2013 года (NA9-Vac mABN⁸, NA9-Vac mABN³⁸ и NA9-Vac mABN⁴⁰), полученные в Институте молекулярной биологии, Academia Sinica, Тайбэй, Тайвань.

Множественное выравнивание и филогенетический анализ проводилось с помощью программы UGENE компании Юнипро (Новосибирск, Россия). Оценка ферментативной активности NA подтипа N9 проводилась по протоколу, основанному на опубликованной ранее методике C.R. Lambre et al., 1993. Для исследования защитной эффективности моноклональных антител к N9-13 против инфекции вирусом A/H7N9-17 проводили пассивную иммунизацию самок мышей линии СВА в возрасте 8–10 недель (по 20 в группе) моноклональными антителами, после чего в сыворотках крови через 5 часов после пассивной иммунизации с помощью ИФА определяли уровни IgG к вирусам H7N9. Одновременно мышей инфицировали интраназально 50% мышинной инфекционной дозой (MID 50) вируса гриппа A/Guangdong/175F003/2016 (H7N9). Эвтаназию животных проводили под эфирным наркозом смещением шейных позвонков; с целью определения вирусной нагрузки отбирали легкие на четвертые сутки после инфекции.

Репродукцию инфекционного вируса в легких определяли титрованием в куриных эмбрионах. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета «Statistica» (версия 6,0) с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

Основные результаты. Филогенетический анализ гликопротеинов N9 вирусов A/H7N9 показал, что вирусы, выделенные в 2017 году вместе с вирусами, выделенными в 2013-2016 гг., образуют отдельную ветвь от A/Anhui/1/2013(H7N9). Это указывает на то, что высокопатогенные вирусы 2017 года эволюционировали от низкопатогенных вирусов H7N9 путем накопления точечных мутаций в антигенных структурах. Изменения в антигенной структуре NA вирусов H7N9, выделенных за период с 2013 по 2017 гг. свидетельствуют о дрейфе генов в гликопротеине NA. Анализ энзиматической активности NA вирусов A/17/Anhui/2013/61(H7N9) и A/Hong Kong/125/2017(H7N9) показал, что активность NA вируса A/Hong Kong/125/2017(H7N9) была примерно в два раза выше активности NA A/17/Anhui/2013/61(H7N9).

При внутрибрюшинном введении мышам смеси МАТ к A/Anhui/1/2013(H7N9) через 5 ч после пассивной иммунизации в крови исследуемых мышей обнаруживались N9— специфические IgG. При внутрибрюшинном введении мышам смеси МАТ к A/Anhui/1/2013(H7N9) через 5 ч после пассивной иммунизации в крови исследуемых мышей обнаруживались N9— специфические IgG. Таким образом, введение МАТ оказывало слабое терапевтическое действие, выражавшееся в 10-кратном снижении заражающего вируса в легких.

Выводы. Таким образом, Молекулярно-генетический анализ последовательностей нейраминидазы указывает на изменения в антигенной структуре нейраминидазы вирусов H7N9 за период с 2013 по 2017 гг., что также подтверждается анализом на ферментативную активность NA. Моноклональные антитела к вирусу 2013 года частично защищают организм от вирусов, выделенных в 2017 году, проявляя слабое терапевтическое действие.

Исследование выполнено в рамках плановой темы прикладных научных исследований FGWG-2023-0005.

ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ MITIS РАЗНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ

Афансьева О.М.¹, Грубер И.М.¹, Бржозовская Е.А.², Асташкина Е.А.¹

¹ ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

² Центр лабораторной диагностики РДКБ РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

Введение. Группа *Mitis* рода *Streptococcus* (SGM) включает близкородственные виды, в частности, *S. oralis* и *S. pneumoniae*, генетически наиболее близкие между собой, их дифференцировка затруднительна, а патогенный потенциал различается. Метод полногеномного секвенирования (whole genome sequencing, WGS) позволяет получить представление о геноме штамма на уровне нуклеотидов, провести генетический анализ близкородственных штаммов и выявлять различия в их факторах патогенности.

Цель работы: определение факторов патогенности (ФП) некоторых SGM на основе WGS штаммов разной вирулентности.

Материалы и методы. Изучали штаммы разной вирулентности, ранее выделенные от больных: *S. oralis* (SO) (ранее депонирован как *S. pneumoniae* 6B №296), *S. pneumoniae* 6B №N° 3353 (SP 3353) и 1121(SP 1121), LD₅₀ которых соответственно, >10⁹, 6*10⁷ и <10⁶ м.к. При анализе WGS исследуемых штаммов использован геном эталонного изолята *S. pneumoniae* Hungary19A-6(serotype 19A).

Результаты. Ранее показана высокая протективная активность поверхностных белоксодержащих антигенов, выделенных из невирулентного штамма SO [Кукина О.М. с соавт., 2020].

По результатам, представленным в таблице, определены различия между штаммами: только в SP 1121 отмечены гены основных адгезинов пневмококков — белков PspA и CbpA/PspC, которые, по данным Kilian M. и Tettelin H (2019), отсутствовали у комменсальных видов. К основным классам поверхностных белков пневмококка, способству-

ющих вирулентности бактерий, относятся холин-связывающие белки, большинство из которых присутствует только в штаммах SP, однако, гены *cbpD* и *pse/cbpE* оказались общими и для SO. CbpD участвует в лизисе клеток, а CbpE — в инвазии и ускользании от иммунитета. Только в SP штаммах отмечено большинство генов аутолиза, в частности *lytC*, кроме *lytB* — общего для всех трех штаммов (следует учесть, что *lytB* участвует в колонизации). Интересно, наличие *srtA* только в SO и SP 3353, поскольку сортаза важна для поверхностных белков с LPxTG мотивом. Фибриноген-связывающий белок, кодируемый *pavA*, связывающий фибринонектин и участвующий в инвазии пневмококка, как и ген адгезина *slrA*, отмечены в SO и SP 3353, но не в SP 1121. Ген *gapA*, кодирующий белок GAPDH, способствующий прохождению барьеров слизистых и ГЭБ — общий для SO и SP. Отмечены гены способствующие адгезии, характерные только для SO: гены островка патогенности *rlrA*, коллаген-связывающего белка *cpbA*, стрептококковой глюкозилтрансферазы *gtfD*, способствующей агрегации бактерий на зубах и образованию кариеса. Общими так же оказались гены ФП *eno* и *nanA* — ферментов, отвечающих за адгезию и колонизацию, а также протеаз, способствующих ускользанию от иммунитета хозяина и влияющих на вирулентность бактерии: *iga*, *htrA*, *tig*, *ccpA*, кроме C5a пептидазы (*scpA/scpB*), отмеченной только в SO. Для жизнедеятельности стрептококков необходимо потребление ионов Fe, Zn и Mn, причем ABC транспортёр Fe (*piaA*) выявлен только в штаммах пневмококка, металлопротеиназы Zn: *zmpC* — только в SO, *zmpB* — в SP; ABC транспортеры Fe (*piuA*) и Mn

(*psaA*) установлены во всех штаммах. Ген консервативного белка пневмолизина (*ply*) закономерно присутствовал в обоих пневмококковых штаммах, но не в **SO**.

Вывод. Отмеченные различия ФП изученных штаммов влияют на их вирулентность. Можно предположить, что высокие протективные свойства поверхностных бе-

локсодержащих антигенов из **SO** в большей степени связаны с наличием генов, ответственных за синтез белков, отвечающих за первый этап инфекционного процесса, что требует их дальнейшего изучения и позволяет рассматривать эти антигены как перспективный компонент в составе комплексных противопневмококковых препаратов.

ТАБЛИЦА. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ SO, SP 3353 И SP 1121.

Класс факторов патогенности	Факторы патогенности (ФП)	Обозначение генов			Локус SP 19A-6
		SO	SP 3353	SP 1121	
Antigen I/II (Agl/II) family of oral strepto-coccal adhesins	<i>sspA</i>	sspA	—	—	—
Cell surface hydrophobicity proteins	<i>cshA</i>	cshA	—	—	—
Adherence	Choline-binding proteins	cbpD			SPH_2399
		—	cbpG	cbpG	SPH_0499
		—	lytA	lytA	SPH_0067
		lytB			SPH_1067
		—	lytC	lytC	SPH_1687
		pce/cbpE			SPH_1039
		—	—	pspA	SPH_0232
	—	—	pspC/cbpA	SPH_2388	
	Collagen binding protein	cpbA	—	—	—
	Fibronectin-binding proteins	<i>pavA</i>	<i>pavA</i>	—	SPH_1066
	Laminin-binding protein	<i>lmb</i>			SPH_1103
	Sortase A	<i>srtA</i>	<i>srtA</i>	—	SPH_1333
	Streptococcal glucosyltransferases	gtfD	—	—	—
	Streptococcal lipoprotein rotamase A	<i>slrA</i>	<i>slrA</i>	—	SPH_0870
	Streptococcal plasmin receptor/ GAPDH	<i>plr/gapA</i>			SPH_2168
<i>rlrA</i> islet	rrgA	—	—	SPH_0572	
	rrgC	—	—	SPH_0575	
	srtC	—	—	SPH_0577	
Enzyme	Hyaluronidase	—	<i>hysA</i>	<i>hysA</i>	SPH_0426
	Neuraminidase A	<i>nanA</i>			SPH_1797
	Streptococcal enolase	<i>eno</i>			SPH_1222
Immune evasion	Capsule	h/o			SPH_0455-65
Iron uptake	Pneumococcal iron acquisition	—	<i>piaA</i>	<i>piaA</i>	SPH_1134
	Pneumococcal iron uptake	<i>piuA</i>			SPH_1988
Manganese uptake	Pneumococcal surface antigen A/ Metal binding protein SloC	<i>psaA</i>			SPH_1759

Protease	C3-degrading protease	cppA			SPH_1566
	C5a peptidase	scpA/ scpB	—	—	—
	IgA1 protease	iga			SPH_1229
	Serine protease	htrA/degP			SPH_2438
	Trigger factor	tig/ropA			SPH_0509
	Zinc metalloproteinase	—	zmpB	zmpB	SPH_0759
		zmpC	—	—	—
Toxin	Pneumolysin	—	ply	ply	SPH_2065

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ NGS ДЛЯ ОЦЕНКИ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА HA-D222G/N В ВИРУСАХ A(H1N1) pdm09, АССОЦИИРОВАННОГО С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ, В РОССИИ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ СЕЗОНАХ 2018-2023 ГГ.

Н.Д. Болдырев, М.Е. Старчевская, Н.П. Колосова, А.В. Даниленко, С.В. Святченко, Г.С. Онхонова, В.Ю. Марченко, А.Б. Рыжиков

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия.

Введение: Среди инфекций, вызывающих ОРВИ, вирус гриппа является одним из самых значимых патогенов, требующих активного эпидемиологического надзора. Мутации D222G/N в гемагглютинине гриппа A(H1N1)pdm09 ассоциированы с увеличенной частотой тяжелых случаев заболевания и смертностью. Таргетное высокопроизводительное секвенирование нового поколения (NGS) и последующий биоинформатический анализ позволяет отслеживать данные мутации для изучения эволюции вируса и выявлять возможный рост числа вирусов с мутациями в циркуляции для эпидемиологического анализа и прогноза.

Цель и задачи: Сравнительный анализ встречаемости полиморфизма HA-D222G/N в вирусах A(H1N1)pdm09, ассоциированного с тяжелым течением заболевания, в эпидемиологических сезонах 2018-2023 гг. в России с применением таргетного секвенирования и биоинформатического анализа.

Материалы и методы: Ампликоны для секвенирования были получены таргетным методом с помощью специфических праймеров, секвенирование проведено по технологии Illumina. Проверка качества данных проводилась с помощью программы FastQC (v. 0.11.9), удаление прочтений низкого качества, удаление адаптеров и праймеров проводилось с помощью программы Cutadapt (v.2.8). Выравнивание прочтений на референс проводилось с помощью программы BWA-MEM (v. 0.7.17). Обработка и анализ файлов SAM/BAM проводилась с помощью программы Samtools (v. 1.9). Для извлечения консенсусной последовательности из BAM файлов использовалась программа iVar (v. 1.1). Была определена частота встречаемости триплетов в позициях 222 и в других переменных позициях рецептор-связывающего домена (RBD) для каждого образца (анализ триплетов был необходим для определения сочетаемости различных

типов генетического окружения и аминокислоты в позиции 222). Для этого из файла выравнивания прочтений BAM извлекались и подсчитывались последовательности целевых триплетов, локализованные в пределах одного прочтения, с помощью оригинальных скриптов, написанных на языке программирования Python (v.3.8.12) с использованием библиотеки pysam (v.0.21.0.).

Основные результаты: В вирусах A(H1N1)pdm09 в сезонах периода 2018-2023 гг. методом количественного определения частоты встречаемости триплетов было определено влияние однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) на кодируемый белок HA. В трех исследуемых сезонах в циркуляции появлялись новые филогенетические клады A(H1N1)pdm09, аминокислотные замены в RBD белка HA которых коррелировали с отбором мутаций D222G/N в нижних дыхательных путях человека. Мониторинг вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в сезоне 2018-2019 гг. в России выявил наличие мутаций D222N/G в мажорном (в пропорции выше 50%) варианте в 38% летальных случаев заражения A(H1N1)pdm09 с преобладанием мутации D222G (78% из этих случаев), ассоциированный с аминокислотами 187A, 188D, 224Q в RBD HA. В сезоне 2019-2020 гг. в России мутации D222G/N выявлены в 18% летальных случаев заражения вирусом A(H1N1)pdm09. Мутации D222G/N в образцах были обнаружены в примерно эквивалентном соотношении (G-тип и N-тип окружения), доля минорных мутаций обоих видов в большинстве образцов была более 10%, в некоторых случаях достигая значений, близких к 50%. В данном сезоне не происходит однозначного отбора одного из вариантов мутации. В сезоне 2022-2023 гг. вирусы гриппа A(H1N1)pdm09 доминировали в циркуляции после периода спорадической выявляемости

с начала пандемии SARS-CoV-2, что может быть связано с мерами по сдерживанию распространения COVID19 и интерференцией между вирусами. В данном сезоне мутации в мажорной форме были выявлены в 40% ис-

следованных случаев с летальным исходом. Выявлялась преимущественно мутация D222N (87% из этих случаев), ассоциированная с аминокислотами 187T, 188D, 224E RBD HA (Таблица 1).

ТАБЛИЦА 1. ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ D222G/N В ГЕНЕ HA В СЕЗОНАХ 2018-2023 ГГ. (РЕПРЕЗЕНТАТИВНАЯ ВЫБОРКА ИЗ ИССЛЕДОВАННЫХ СЛУЧАЕВ С ЛЕТАЛЬНЫМ ИСХОДОМ) *НД-НИЖЕ ПРЕДЕЛОВ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

	Изолят	222D %	222G %	222N %	Тип генетического окружения
Сезон 2018-2019					
1	A/Russia/386/2019	НД	98,1	НД	G-тип, 187A, 188D, 224Q
2	A/Russia/261/2019	0,2	97,8	НД	G-тип, 187A, 188D, 224Q
3	A/Yekaterinburg/198/2019	0,2	97,5	НД	G-тип, 187A, 188D, 224Q
4	A/Vologda/332/2019	0,2	97,4	НД	G-тип, 187A, 188D, 224Q
5	A/Russia/825/2019	3,4	95,3	НД	G-тип, 187A, 188D, 224Q
6	A/Irkutsk/723/2019	0,2	93,9	3,7	G-тип, 187A, 188D, 224Q
7	A/Astrakhan/4/2019	1,6	93,2	НД	G-тип, 187A, 188D, 224Q
8	A/Samara/829/2019	12	31,5	54,5	G-тип, 187A, 188D, 224Q
9	A/Samara/483/2019	17,5	29,9	50,5	G-тип, 187A, 188D, 224Q
Сезон 2019-2020					
1	A/Yekaterinburg/1819V/2020	0,1	98,8	0,0	G-тип, 187A, 188D, 224Q
2	A/Ulyanovsk/165-1V/2020	11,5	49,0	38,1	G-тип, 187A, 188D, 224Q
3	A/Vologda/21V/2020	32,8	17,6	48,5	N-тип 2019-2020, 187A, 188A, 224E
4	A/Tver/237-1V/2020	1,3	34,2	63,9	N-тип 2019-2020, 187A, 188A, 224E
5	A/Vologda/10V/2020	1,2	42,0	55,0	N-тип 2019-2020, 187A, 188A, 224E
Сезон 2022-2023					
1	A/Saratov/181-113V/2022	НД	НД	94,7	N-тип 2022-2023, 187T, 188D, 224E
2	A/Novosibirsk/198-t22V/2022	0,3	0,0	95,1	N-тип 2022-2023, 187T, 188D, 224E
3	A/Tyumen/185-113V/2022	0,3	1,0	94,3	N-тип 2022-2023, 187T, 188D, 224E
4	A/Murmansk/197-l6V/2022	0,2	0,0	95,0	N-тип 2022-2023, 187T, 188D, 224E
5	A/Kaliningrad/217-lps10V/2022	0,2	4,9	90,1	N-тип 2022-2023, 187T, 188D, 224E
6	A/Sakhalin/210-ll58V/2022	0,3	0,0	95,5	N-тип 2022-2023, 187T, 188D, 224E
7	A/КНМАО/207-t22V/2022	0,1	94,2	0,0	N-тип 2022-2023, 187T, 188D, 224E

На основе полученных за три эпидемических сезона данных была выдвинута гипотеза о зависимости отбора мутаций D222G/N в HA вирусом A(H1N1)pdm09 от первичной структуры рецептор-связывающего домена. Биоинформатический анализ связи возникновения определенной мутации в позиции 222 с позициями, определяющими G-тип или N-тип RBD, выявил частичную зависимость. Таким образом, отличия в генетическом окружении повышают вероятность отбора либо 222G, либо 222N, не исключая полностью возможность отбора другого, менее оптимального варианта — например, присутствия небольшой доли вирусов с 222N при G-типе окружения.

Заключение/выводы: Ярко выраженная способность вируса A(H1N1)pdm09 быстро адаптироваться к

размножению в нижних дыхательных путях за счет закрепления в популяции мутации D222G/N может являться важным фактором патогенности. Для выявления и оценки значимости таких однонуклеотидных замен важно знать, какое место в триплете занимает новый нуклеотид и к какой аминокислотной замене он приводит. Вероятность отбора одной из этих мутаций может зависеть от других аминокислотных замен в рецептор-связывающем домене, структура которого меняется в процессе эволюции вируса. Таким образом, на основе анализа генетического окружения в рецептор-связывающем домене HA A(H1N1)pdm09 можно предположить более высокую вероятность возникновения одной из двух исследованных мутаций в позиции 222 HA.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗОЛЯТОВ НОРОВИРУСА РЕДКОГО ГЕНОТИПА GII.8[P8], ВЫЗВАВШЕГО ВСПЫШКУ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ

Жиравковская Е.В., Тикунова Н.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), Новосибирск, Россия

Введение. Норовирусы (NoV) считаются одной из частых причин вспышек и спорадических случаев острых кишечных инфекций (ОКИ) у людей всех возрастов. Значительное генетическое разнообразие NoV не позволяет формироваться постоянному иммунитету и возможно повторное заражение NoV другого генотипа.

Цель исследования: генетический анализ NoV, вызвавшего семейную вспышку ОКИ.

Материалы и методы. Методом ОТ-ПЦР с использованием панели лабораторных праймеров для детекции генов норовирусов были исследованы образцы фекалий, собранные во время семейной вспышки ОКИ в марте 2019 г. Через два дня после заболевания шестилетнего ребенка, посещавшего детский сад, схожие симптомы (неоднократная рвота, понос и повышенная температура тела) появились у других членов семьи — трехлетнего ребенка и родителей. Выделенные изоляты NoV были охарактеризованы путем секвенирования фрагмента генома, кодирующего РНК-зависимую РНК полимеразу [P] и капсидный белок VP1. Полученные последовательности были аннотированы и депонированы в международную базу GenBank (NCBI, USA).

Результаты. Сравнительный анализ частичных последовательностей двух генов показал, что вспышку ОКИ вызвал NoV GII.8[P8] (GenBank: MK886712-MK886713). Интересно, что у младшего ребенка при этом наблюдалась повторная NoV инфекция. Причиной первой инфекции в мае 2018 г. был NoV GII.2[P16] (GenBank: MK886705), и в этом случае у других членов семьи симптомов ОКИ не на-

блюдалось. В результате ретроспективного опроса было выяснено, что в течение двух недель в детском саду схожие симптомы ОКИ наблюдались у 12 детей, а также у их родственников различных возрастов. Все заболевшие дети находились на амбулаторном лечении. Взрослые в поликлинику не обращались.

Генотип GII.8[P8] относят к редко встречающимся вариантам. Филогенетический анализ показал, что Новосибирские изоляты NoV GII.8[P8] имеют высокую степень идентичности (99,1-99,3%) с штаммами, выделенными в 2018 году в Южной Корее (GenBank: MN461138, MN461148) и в Онтарио, Канада (GenBank: MW661257). Стоит отметить, что NoV GII.8 с 2016 по 2020 циркулировал в Юго-Восточной Азии (Южная Корея, Таиланд и Китай), а в 2020 году был выявлен на территории США.

Выводы. Многолетний мониторинг генетического разнообразия NoV в Новосибирске позволил впервые зафиксировать появление в России нового и редко встречающегося варианта GII.8[P8], который вызвал вспышку ОКИ у детей, посещавших детский сад и их родственников. Молекулярно-генетический анализ доступных данных показал, что NoV GII.8[P8] был занесен на территорию Новосибирска из Юго-Восточной Азии. Полученные данные подтверждают необходимость постоянного мониторинга спектра генотипов NoV, причем не только у госпитализированных пациентов, но и находящихся на амбулаторном лечении. Исследование вели по Государственному заданию ИХБФМ СО РАН № 121031300043-8.

ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОБЛОТТИНГА В СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА

Болотина Е.С., Яковлев И.М., Фомина О.В., Антипин Д.А., Пилипко С.С.

ГБУЗ «Областной кожно-венерологический диспансер № 4», Магнитогорск, Россия

Введение. Сифилис — инфекционное заболевание, вызываемое бледной трепонемой (*Treponema pallidum*), передающееся преимущественно половым путем, характеризующееся поражением кожи, слизистых оболочек, нервной системы, внутренних органов и опорно-двигательного аппарата и отличающееся стадийным, рецидивирующим, прогрессирующим течением. Разнообразие проявлений наряду с высокой эпидемической опасностью, ростом заболеваемости населения РФ (показатель на 100 тыс. населения: 2020 г. — 10,5, 2021 г. — 14,5, 2022 г. — 17,5) придает особую актуальность совершенствованию методов диагностики данного заболевания. Диагностика сифилиса базируется на комплексе критериев, включающем клинические проявле-

ния заболевания, применении прямых методов выявления возбудителя или его генетического материала, обнаружение антител к *Treponema pallidum* в крови и спинномозговой жидкости и анализе «эпидемической цепочки».

Лабораторная диагностика сифилиса регламентирована «Федеральными клиническими рекомендациями по дерматологии и косметологии 2020-2023» (ФГБУ ГН ЦДК) по ведению больных с инфекциями, передаваемыми половым путём, и урогенитальными инфекциями и Приказом МЗ РФ от 26.03.2001 № 87 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса».

Для массового скрининга населения с целью выявления лиц, больных активными формами сифилитической

инфекции, рекомендовано использовать серологические нетрепонемные тесты. Для некоторых целевых групп рекомендовано использовать сочетание трепонемного и нетрепонемного тестов, к ним относятся: беременные, в том числе направляемые на искусственное прерывание беременности; доноры крови, спермы и тканей; пациенты психиатрического, неврологического, кардиологического, офтальмологического и оториноларингологического профиля; ВИЧ-инфицированные лица.

Цель и задачи. Оценка диагностической значимости метода иммуноблоттинга в серологической диагностике сифилиса, рекомендованного в качестве теста второй линии в качестве дополнительной диагностики сифилиса.

Материалы, методы. Учитывая материальную базу лаборатории, высокую пропускную способность, доступность, простоту выполнения, а также чувствительность, специфичность и воспроизводимость серологических методов диагностики сифилиса в лаборатории ГБУЗ «ОКВД № 4» применяется комплекс серологических реакций (КСР): микрореакция преципитации с кардиолипновым антигеном (МРП) с инактивированной сывороткой крови, иммуноферментный анализ (ИФАсум.), реакция пассивной геммагглютинации (РПГА) и метод иммуноблоттинга (ИБ).

Реагенты, используемые для постановки ИБ:

- «Лайн-Блот Сифилис» тест-система для выявления антител класса G к отдельным антигенам *Treponema pallidum* с использованием рекомбинантных антигенов. Производитель ЗАО «Эколаб» г. Электрогорск.
- «*Treponema pallidum* IgG Вестерн-блот» тест-система для выявления антител класса G к отдельным антигенам *Treponema pallidum* в сыворотке или плазме крови мето-

дом Вестерн-блот. Производитель Euroimmun Германия
Материал для исследования: сыворотка крови.

Результаты.

С 2016 г. по 2022 г. в лаборатории ГБУЗ «ОКВД № 4» методом иммуноблоттинга было обследовано 230 пациентов с целью подтверждения скрининговых методов исследования или в качестве дополнительной диагностики сифилиса, при подозрении на наличие данного заболевания, но отрицательных результатах других исследований.

В наборе «Лайн-Блот Сифилис» использованы рекомбинантные аналоги антигенов *Treponema pallidum* ТрN15, ТрN17, ТрА, ТрN47. В качестве контроля специфичности имеются 4 контрольные полосы на тест-полоске, представляющие собой антиген *E. coli*. В наборе «*Treponema pallidum* IgG Вестерн-блот» использованы рекомбинантные аналоги антигенов *Treponema pallidum* ТрN15, ТрN17, ТрN45, ТрN47. В качестве контроля специфичности используется оценочный шаблон, для оценки правильности проведения инкубации используется контрольная полоса тест-полоски.

Аналоги антигенов нанесены в виде поперечных полос на тест-полоски из нитроцеллюлозной мембраны.

Учет результатов проводят визуально, сравнивая интенсивность окраски антигенных линий с интенсивностью окраски контрольных линий:

- отрицательный результат — отсутствие окрашенных полос или наличие одной полосы с интенсивностью окрашивания «0,5+»,
- неопределенный результат — одна четкая полоса специфического антигена,
- положительный результат — более одной четкой полосы специфического антигена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОБЛОТТИНГА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КСР

Вариант результатов КСР		Иммуноблот отрицательный	Иммуноблот положительный	Иммуноблот неопределенный
МРП	трепонемные тесты			
МРП +	ИФАсум. +, РПГА -/сомнит	10	15	14
	ИФАсум. -, РПГА +	1		
	ИФАсум. +, РПГА +	9	40	2
	ИФАсум. -/сомнит, РПГА -/сомнит	15	1	2
МРП —	ИФАсум. +, РПГА +	22	47	9
	ИФАсум. +, РПГА -/сомнит	9	6	9
	ИФАсум. -/сомнит, РПГА +		2	
	ИФАсум. -/сомнит, РПГА -/	11	4	2
Всего		77	115	38

Выводы.

1. Только прямые методы выявления *Treponema pallidum* или ее генетического материала являются абсолютным доказательством наличия заболевания. Это методы темнопольной микроскопии и ПЦР-анализ, которые используются для диагностики ранних форм заболевания (первичный и вторичный сифилис) с клиническими проявлениями (эрозивно-язвенные элементы) и для подтверждения врожденного сифилиса.
2. Использование четырех видов серологических реакций для диагностики сифилиса (МР, РПГА, ИФА на IgG + IgM, ИБ) приводит к тому, что у обследуемых пациентов наблюдаются различные сочетания положительных и отрицательных результатов тестов, ко-

торые необходимо интерпретировать в комплексе с клиническими проявлениями заболевания, данными анамнеза, а в некоторых случаях — с динамической оценкой изменений как клинических, так и лабораторных реакций:

- при трех положительных результатах КСР (МРП +, ИФА сум +, РПГА +) ИБ был положительным только в 78%,
 - при положительных результатах одного, либо двух трепонемных тестов и отрицательном результате не-трепонемного теста (МРП) ИБ был положительным в 56,4%,
 - при отрицательных и/или сомнительных результатах одного, либо двух трепонемных тестов ИБ был положительным в 14,3%.
3. Несмотря на большое число имеющихся серологических методов, вопросы диагностики сифилиса нельзя считать окончательно решенными. Наиболее актуальным остается вопрос решения ложноположительных и ложноотрицательных результатов серологических реакций. В трепонемных тестах биологически ложноположительные реакции могут наблюдаться при

ВИЧ-инфекции, аутоиммунных заболеваниях, во время беременности, при онкологических и некоторых инфекционных заболеваниях, у лиц пожилого возраста, а также при невенерических трепонематозах и спирохетозах. Основными причинами получения ложноотрицательных результатов при диагностике сифилиса являются:

- так называемый эффект прозоны — нетрепонемные агглютинационные тесты могут давать слабopоложительную или отрицательную реакцию, обусловленную избытком антител, когда нормальная реакция «антиген–антитело» не завершается или блокируется;
- так называемый эффект диагностического окна, что обусловлено отрицательными результатами серологических реакций на сифилис, вызванными более поздней выработкой антител (как правило, при первичном сифилисе);
- отрицательный (как и положительный) неадекватный результат серологических реакций на сифилис может регистрироваться у ВИЧ-инфицированных пациентов или у пациентов с признаками иммунодефицита другого происхождения.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА БАЗЕ БУЗ ВО «ВОКЦПиБС» В ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ В 2020-2022 ГОДАХ

Попович Ю.С.¹, Ситник Т.Н.^{1,2}, Донская М.А.¹

¹ БУЗ ВО «Воронежский областной клинический центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Воронеж

² ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Минздрава России, г. Воронеж

Острые кишечные инфекции (ОКИ) широко распространены и являются одними из лидеров инфекционной заболеваемости в Воронежской области, за исключением острых инфекций дыхательных путей (ОИВДП) и COVID-19. На долю ОКИ за последние три года приходится 18-30% случаев.

Цель исследования: провести эпидемиологический анализ вклада молекулярной диагностики в этиологическую расшифровку ОКИ в Воронежской области за 2020-2022 г.

Материалы и методы: Сведения по заболеваемости ОКИ получены из отчетов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Воронежской области» по форме Росстата №2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях».

Использованы данные лаборатории вирусологических исследований БУЗ ВО «ВОКЦПиБС», выполняющей централизованные исследования в рамках ОМС для медицинских организаций Воронежской области. Направления на исследование и результаты формируются через единую медицинскую информационную систему региона. Метод исследований — ПЦР, при исследовании кала определяется ДНК (РНК) микроорганизмов: *Shigella spp.*, *E. coli (EIEC)*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Adenovirus F*, *Rotavirus A*, *Norovirus 2* генотип, *Astrovirus*.

За три года исследовано 20885 проб, доставленных из 25 районов области и 11 медицинских организаций г. Во-

ронеза. Получено 5977 положительных результатов, что составило 28,6%.

Статистическая обработка проведена с использованием возможностей таблиц LibreOffice 6.3 Calc.

Результаты и обсуждение: В 2020-2022 г.г. уровни заболеваемости ОКИ возрастали и составили соответственно 182,7; 210,3; 256,5 на 100 тысяч населения. При этом ограничительные мероприятия по COVID-19 повлияли на заболеваемость ОКИ: уровни ниже средней многолетней за предыдущие 3 года (318,1 на 100 тысяч населения). При этом снизилась доступность лабораторных исследований на ОКИ у населения, ограничиваясь в основном госпитализированными больными и детьми младших возрастов. В динамике за 3 года удельный вес ОКИ установленной этиологии достоверно не менялся: 45,8% в 2020 г., 47,0% в 2021 г. и 47,0% в 2022 году.

Выше была обращаемость за медицинской помощью и лучше проводилась лабораторная диагностика ОКИ у детей до 17 лет: их доля колебалась от 81,0% до 90,7% среди ОКИ установленной этиологии и от 69,6% до 76,0% из не уточненных. В детской возрастной структуре преобладают дети первых двух лет жизни: 50,5%-49,4%-40,5% из ОКИ установленной этиологии и 44,8%-43,3%-29,2% из не расшифрованных этиологически.

В структуре заболеваемости расшифрованных ОКИ преобладают вызываемые вирусами: 77,0% в 2020 г., 77,4%

в 2021 г. и 77,9% в 2022 г. Из вирусных возбудителей чаще встречались ротавирусы (51,2%-52,2%-53,8% за 3 года), второе место занимали норовирусы, с постепенным снижением их доли (45,4%-40,8%-39,3%), однако разница статистически недостоверна.

Количество доставленных проб в лабораторию БУЗ ВО «ВОКЦПиБС» от больных ОКИ в динамике возрастало: в

2020 г. — 4413, в 2021 г. — 7443, в 2022 г. — 9029. Вирусная этиология была подтверждена в 38,9%-31,5%-27,3% от числа исследованных проб, бактериальная — в 25,6%-17,6%-15,5% соответственно за 2020-2021-2022 гг.

Данные лабораторной диагностики подтверждают вышеприведенную статистику заболеваемости — лидерами являются ротавирусы (таблица).

СТРУКТУРА ОПРЕДЕЛЕННЫХ РНК/ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ В 2020-2022 Г.Г.

ДНК/РНК возбудителей	2020 г.		2021 г.		2022 г.	
	всего	%	всего	%	всего	%
Rotavirus A	750	47,0	1030	47,8	1093	49,1
Norovirus 2 генотип	696	43,6	866	40,2	900	40,4
Astrovirus	38	2,4	179	8,3	106	4,8
из них сочетанные*)	77		146		148	
Campilobacter spp.	74	4,6	53	2,5	84	3,8
Adenovirus F	8	0,5	8	0,4	15	0,7
Shigella spp., E. coli (EIEC)	12	0,8	5	0,2	7	0,3
Salmonella spp.	19	1,2	13	0,6	21	0,9
Всего положительных	1597		2154		2226	

*) суммарно *Rotavirus+Norovirus*, *Rotavirus+Astrovirus*, *Norovirus+Astrovirus*

Выявление ДНК бактериальных возбудителей являлось дополнительной методикой к проведению традиционных культуральных исследований и позволяло более быстро решать вопрос назначения антимикробной терапии. Также, в случае с кампилобактериозом, позволило улучшить этиологическую расшифровку данной нозоформы, по сравнению с возможностями бакпосева.

Выводы: благодаря молекулярным исследовани-

ям, проведенным в 2020-2022 годах на базе лаборатории вирусологических исследований БУЗ ВО «ВОКЦПиБС», по области улучшилась диагностика и этиологическая расшифровка ОКИ. Улучшение лабораторной диагностики позволяет выявить повсеместное распространение ОКИ, дает возможность изучения клинических и эпидемиологических особенностей данной инфекции, способствует назначению адекватного лечения.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ КАРБАПЕНЕМ-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В ОТДЕЛЕНИИ РЕАНИМАЦИИ

Туремуратова А.Б., Лавриненко А.В., Кадырова И.А.

Научно-исследовательская лаборатория Института наук о жизни, Медицинский университет Караганды, Караганды, Казахстан

Цель. Изучить распространение карбапенем-устойчивых штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в отделении реанимации стационаров г. Караганды в период 2020-2022 гг.

Материалы и методы. Были изучены изоляты *P. aeruginosa* (n=96), выделенные от пациентов отделений реанимации (ОРИТ) стационаров г. Караганды в период с 2020 по 2022 гг. Идентификация *P. aeruginosa* проводилась с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии (Microflex-LT, Biotyper System, Bruker Daltonics, Германия). Чувствительность к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом, интерпретация чувствительности проведена в соответствии с рекомендациями EUCAST (version 12).

Определение карбапенем-устойчивых штаммов проводили фенотипическими методами (CIM-test, Hodge test) и молекулярно-генетическим (ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96: наборы «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48FL», «АмплиСенс MDR MBL-FL»). Статистическую обработку данных осуществляли в программе WHONET (version 5.6) и онлайн платформе AMRcloud.

Результаты. В результате исследования штаммы *P. aeruginosa* были выделены из мокроты в 51,04% случаев (n=49), из бронхоальвеолярного лаважа в 11,46% случаях (n=11), из раны в 12,5% случаях (n=12), из мочи в 11,46% случаях (n=11), из жидкости в 7,29% случаях (n=7) и из

крови в 6,25% случаях (n=6). Из 96 *P.aeruginosa* нечувствительными по ДДМ оказались 60 штаммов к меропенему и имипенему одновременно (95% ДИ 50,42-69,62). Из них по фенотипическим тестам было детектировано 48 штаммов, продуцирующих карбапенемазы (остальные 12 штаммов с отрицательным результатом не использовались в дальнейшем исследовании). Молекулярно-генетический тест подтвердил 62,5% (n=30) случаев с положительными фенотипическими тестами, это связано с использованием двух наборов для поиска определенных генов резистентности (устойчивость остальных 18 штаммов связано с другими механизмами резистентности). В результате настоящего исследования у *P.aeruginosa* были определены следующие

гены резистентности: 66% (n=20) VIM, 44% OXA-48 (n=10).

Выводы. Штаммы *P.aeruginosa*, выделенные от пациентов ОРИТ обладают высоким уровнем устойчивости к антимикробным препаратам группы карбапенемов. Устойчивость к карбапенемам в настоящем исследовании обусловлена продукцией генов VIM и OXA-48. Данные гены резистентности широко распространены на территории Азии, России, Белоруссии, Индии, Турции, Китая, а также других стран Европы и Южной Америки. В связи с полученными результатами исследования следует обратить внимание на мониторинг генов резистентности в стационарах для своевременной диагностики и рационального назначения антимикробных препаратов группы карбапенемов.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА VP7(T13) ВИРУСА КЕМЕРОВО ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В ФОРМАТЕ ИФА

Куклянова В.В.¹, Стуколова О.А.², Карганова Г.Г.³, Долгова А.С.¹

¹ ФБУН НИИЭМ имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Москва, Россия

Вирус Кемерово (KEMV) впервые был выделен из иксодовых клещей *Ixodes persulcatus* и из крови больных в Кемеровской области в Западной Сибири. KEMV относят к клещевым арбовирусам рода *Orbivirus* и выделяют в генетическую группу вирусов Грейт-Айленд (GIV). Вирус Кемерово вызывает у людей лихорадочное состояние и асептический менингит. В последние годы вирус Кемерово был найден в 9 регионах РФ. KEMV склонен к реассортации из-за наличия сегментированной dsRNA. Этот факт был подтвержден различием генетических последовательностей сегментов у вариантов вируса, выделенного в 2010 году, и у вариантов вируса, выделенного в 1960 году. Нейтрализующие антитела к KEMV были обнаружены у лошадей, крупного рогатого скота, полевки и птиц. Белок внутренней оболочки VP7(T13) доступен для связывания с антителами и является основным специфическим антигеном серогруппы орбовирусов. Для контроля заболеваемости вирусом Кемерово животных в РФ планируется разработка ИФА тест-системы на основе белка VP7(T13).

Цель работы: получить очищенный рекомбинантный белок VP7(T13) для применения его в качестве антигена в тест-системе на основе ИФА.

Методы. Для сборки целевого гена *de novo* был применен метод SOE PCR. Была создана экспрессионная конструкция на основе плазмиды pGD-His-TF. В плазмиде содержится полигистидиновый тег для очистки и дополнительный белок слияния TF, способствующий растворимости целевого белка. Для синтеза белка использовался штамм *Escherichia coli*-BL21(DE3). Индукция проводилась в течение 18 часов при 20°C, 180 об/мин, с добавлением 0,5 mM IPTG. Очистка белка осуществлялась с помощью Ni-аффинной хроматографии в нативных условиях. Эффективность очистки полученного белка оценивали методом аналитического электрофореза в 10% полиакриламидном

геле в присутствии SDS по методу Лэммли. Для реакции ИФА были взяты образцы асцита и сывороток крови мышей. В качестве положительных образцов были взяты: асцит мыши, зараженной KEMV; сыворотки крови мыши, собранные на 4-ый, 8-ой и 14-ый день после заражения KEMV. В качестве отрицательных контролей — сыворотки крови незараженных мышей. Также использовали асцит мыши, зараженной вирусом Вад Медани (WMV), поскольку белки данных вирусов обладают гомологией. Асцит и сыворотки крови мышей наносили на планшет в разных разведениях. Белок TF-VP7(T13) сорбировали на планшет в концентрациях 1 мкг/мл и 3 мкг/мл.

Результаты. В данной работе был синтезирован ген целевого белка VP7(T13). Создана экспрессионная конструкция pGD-His-TF-VP7(T13) для синтеза белка. Подбирая условия индукции, удалось получить целевой белок в растворимой фракции. Белок TF-VP7(T13) был очищен Ni-аффинной хроматографией в нативных условиях с использованием градиента концентрации имидазола во время элюции. С полученным белком был проведен ИФА. Было подтверждено связывание антител из асцита мыши, зараженной KEMV с белком TF-VP7(T13). Также антитела из сыворотки крови мыши 14-го дня заражения связались с белком TF-VP7(T13). Антитела из асцита мыши, зараженной WMV, не связались с белком TF-VP7(T13). Получены различные значения оптической плотности при разных разведениях образцов и разных концентрациях белка.

Выводы. По результатам проделанной работы был получен очищенный растворимый белок TF-VP7(T13). При проведении ИФА отсутствовало неспецифическое связывание антител с белком. Предварительно показана работоспособность тест-системы. В дальнейшем планируется использование тест-системы для мониторинга заболеваемости KEMV у животных.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ В ЧЕЧЕНСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

Муртазалиев Х.Х.¹, Жамборова М.Х.², Макарова М.А.²

¹ Республиканский клинический центр инфекционных болезней, Грозный, Россия

² Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Диарейный синдром — наиболее характерное проявление ВИЧ-инфекции, который наблюдается у 70 % больных и часто становится причиной летального исхода. Степень выраженности диарейного синдрома не зависимо от иммунного статуса, как правило, зависит от конкретных микроорганизмов, колонизирующих желудочно-кишечный тракт. В то же время *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.* могут вызвать особенно тяжелые или длительные заболевания при ВИЧ-инфекции. По данным ряда исследователей, у ВИЧ-инфицированного взрослого населения показатели заболеваемости бактериальными кишечными инфекциями в 10 раз выше, чем среди населения в целом.

Цель. Изучить распространенность бактериальных возбудителей острых кишечных инфекций при диарейном синдроме у ВИЧ-инфицированных жителей Чеченской Республики (г. Грозный).

Материалы и методы. Пробы испражнений (n=191) ВИЧ-инфицированных пациентов с диарейным синдромом изучали методом ПЦР в реальном времени с двумя набора-

ми реагентов: 1. «АмплиСенс® ОКИ бакто-скрин-FL» для выявления ДНК микроорганизмов: комплекса *Shigella sp./EIEC, Salmonella spp.*, комплекса *Shigella dysenteriae* I типа/ EHEC, *Campylobacter sp.*; 2. «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» для выявления ДНК диареегенных *E.coli* (DEC) пяти патогрупп EPEC, EHEC, ETEC, EIEC, EAgEC.

Результаты. Генетические маркеры искомым патогенов были выявлены у 40 (20,94%) обследованных лиц. Этиологическая структура бактериальных ОКИ была представлена значимым преобладанием диареегенных *E. coli* 84,78% (n=39) из них: EPEC — 48,72% (n=19), STEC — 25,51% (n=8), EIEC — 17,95% (n=7), EAgEC — 7,69% (n=3) и ETEC — 5,13% по сравнению с 10,87% (n=5) термофильных *Campylobacter spp.* и 4,35% (n=2) *Salmonella spp.*, p < 0,05. По суммарным данным в положительных пробах были выявлены 46 генетических детерминант. У 31 (77,50%) ВИЧ-инфицированных диарейный синдром был обусловлен одним возбудителем ОКИ (моно-инфекция) у 15 обследованных (22,50%) — сочетанной этиологией (Таблица 1). Во всех случаях сочетанных ОКИ присутствовали генетические детерминанты DEC.

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ВИЧ — ИНФИЦИРОВАННЫХ ЖИТЕЛЕЙ ЧЕЧЕНСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

Возбудитель	Всего		Моно-инфекция		Сочетанные инфекции	
	абс (%)	95% ДИ	абс (%)	95% ДИ	абс (%)	95% ДИ
<i>Campylobacter spp.</i>	5 (10,87)	4,73-23,04	2 (6,45)	1,79-20,72	3 (20,00)	7,05-45,19
<i>Salmonella spp</i>	2 (4,35)	1,20-14,54	2 (6,45)	1,79-20,79	0 (0)	0-20,39
Диареегенные <i>E. coli</i> в том числе:	39 (84,78)	71,77-92,43	27 (87,10)	71,15-94,87	12 (80,00)	54,81-92,95
EAgEC	3 (7,69)	2,65-20,32	2 (7,41)	2,06-23,37	1 (8,33)	1,49-35,38
EIEC	7 (17,95)	8,98-32,67	4 (14,81)	5,91-32,47	3 (25,00)	8,89-53,23
ETEC	2 (5,13)	1,42-16,89	1 (3,70)	0,66-18,28	1 (8,33)	1,49-35,38
EPEC	19 (48,72)	33,87-63,80	14 (51,85)	33,98-69,26	5 (41,67)	19,33-68,05
STEC	8 (25,51)	10,78-35,33	6 (22,22)	10,61-40,75	2 (16,67)	4,70-44,81
Всего	46 (93,88)	83,48-97,90	31 (67,39)	52,97-79,13	15 (32,61)	20,87-47,03

Заключение. Проведенное исследование показало, что практически у каждого пятого ВИЧ-инфицированного в Чеченской Республике причиной диарейного заболевания являлись DEC, что подтвердило их актуальность в структуре ОКИ. Лабораторная диагностика этих возбудителей возможна только с использованием

молекулярно-генетических методов. Учитывая тот факт, что диарея-ВИЧ-инфицированных это полиэтиологическое заболевание необходимо внедрять комплексный, быстрый, надежный и доступный метод идентификации широкого спектра возбудителей, вызывающих вторичные инфекции.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КОРИ

Носова А.О., Богословская Е.В., Цыганова Г.М., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Вирус кори вызывает острое инфекционное заболевание, обладающее высокой контагиозностью. Несмотря на то, что корь относится к заболеваниям, которые возможно контролировать с помощью вакцинации, в последние годы во всем мире регистрируется увеличение числа случаев кори. За первые семь месяцев 2023 года в мире по данным Всемирной организации здравоохранения зарегистрировано 152,5 тыс. случаев кори по сравнению с 59,6 тыс. в 2021 году. Наибольшее число заболевших корью выявлено в Индии, Йемене и Пакистане. В России с начала 2023 года зарегистрировано более 1700 случаев.

В связи с высокой контагиозностью заболевания важна ранняя дифференциальная диагностика кори. Из существующих методов лабораторной диагностики кори наибольшей чувствительностью на раннем этапе заболевания обладают молекулярно-генетические методы, в частности, на основе метода ПЦР. На сегодняшний день в России для выявления РНК вируса кори методом ПЦР доступен единственный набор реагентов «АмплиТест® Корь» (ФГБУ «ЦСП», Россия). В период вспышки кори в 2023 году данный набор хорошо зарекомендовал себя, однако стало понятно, что для максимально быстрого реагирования на вспышку необходимы быстрые тесты. В последние годы активно развиваются технологии, основанные на изотермической амплификации, в частности, реакция петлевой изотермической амплификации (LAMP), с помощью которой результаты можно получить в течение нескольких минут. Разработка таких подходов позволит в будущем проводить исследование быстрее и без применения дорогостоящего оборудования на месте оказания медицинской помощи (у постели больного).

Цель и задачи. Разработка методики для выявления РНК вируса кори методом петлевой изотермической амплификации в режиме реального времени.

Материалы и методы. В качестве мишени для подбора диагностических олигонуклеотидов была выбрана консервативная область гена нуклеопротеина. Выбор праймеров и зондов проводили на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей из базы данных NCBI, которое включало 721 представителя. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей было проведено с помощью

MAFFT. Подбор праймеров проводили с использованием программы Primer Explorer V (Fujitsu, Япония).

В качестве материала для исследования использовали клинический образец мазка из носо- и ротоглотки от пациента с подтвержденным диагнозом кори. Для выделения РНК вируса кори из образцов использовали набор «АмплиТест Рибо-преп» (ФГБУ «ЦСП», Россия).

В качестве набора сравнения использовали набор реагентов «АмплиТест® Корь» (ФГБУ «ЦСП», Россия), который позволяет выявлять вирус кори методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с аналитической чувствительностью 10^3 коп/мл. В качестве мишени в данном наборе используется фрагмент гена нуклеопротеина.

Основные результаты. Для выявления РНК вируса кори методом LAMP были подобраны 6 праймеров. Детекция результатов основана на использовании праймер-зонда, представляющего из себя петлевой праймер, соединенный с меченой флуоресцентной меткой синтетической последовательностью и комплементарной ей последовательностью, меченой гасителем флуоресценции. Накопление флуоресцентного сигнала происходит при вытеснении Bst-полимеразой последовательности с гасителем.

Разработанная методика позволяет в одну стадию и при постоянной температуре проводить этап обратной транскрипции и амплификации нуклеиновых кислот с помощью 6 праймеров, Bst-полимеразы и обратной транскриптазы. Для сравнения аналитической чувствительности разработанной методики на основе LAMP использовали ПЦР-набор «АмплиТест® Корь» и серию 10-кратных разведений образца с вирусом кори. Амплификацию проводили при 60°C с детекцией сигнала каждые 30 сек., используя прибор CFX. Согласно полученным результатам, чувствительность разработанной методики значительно уступает методу сравнения (таблица 1), поскольку последнее разведение образца (10^{-7}) находится ниже аналитической чувствительности ПЦР-теста и его выявление носит случайный характер, а предыдущее разведение (10^{-6}) выявлялось обеими методиками. Кроме того, в отличие от метода ПЦР использование LAMP позволило получить результаты менее чем за 10 минут.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ ДВУМЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Разведение образца	LAMP	ПЦР
	мин	Ct
Исходный образец	3,62	16,93
10^{-1}	3,96	19,98
10^{-2}	4,51	23,12
10^{-3}	5,23	26,43

10 ⁻⁴	5,97	29,31
10 ⁻⁵	6,63	32,78
10 ⁻⁶	8,39	35,22
10 ⁻⁷	-	38,65

Выводы. Разработана методика быстрого выявления РНК вируса кори с использованием технологии LAMP, по-

зволяющая с высокой эффективностью выявлять РНК вируса кори с чувствительностью, близкой к ПЦР.

УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ ПАЛЕОБАКТЕРИИ АРХЕОЛОГИЧЕСКИХ ПАМЯТНИКОВ И ПАЛЕОНТОЛОГИЧЕСКИХ МЕСТОНАХОЖДЕНИЙ ЯКУТИИ

Гончаров А.Е.^{1,2,3}, Чепрасов М.Ю.⁴, Колоджиева В.В.¹, Азаров Д.В.^{1,2}, Крыленков В.А.⁵, Асланов Б.И.¹

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины

² ФБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России

³ Санкт-Петербургский государственный университет

⁴ ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова»

⁵ ОО «Санкт-Петербургский союз ученых»

Актуальность. Многолетнемерзлые породы в Арктике на протяжении сотен тысяч лет являются естественным резервуаром древней микробиоты, в том числе, симбионтов и патогенов животных и человека.

Процесс вытаивания палеомикроорганизмов или их генетического материала из деградирующей в связи с глобальными климатическими изменениями вечной мерзлоты сопряжен с риском возникновения новых или активизации забытых инфекционных заболеваний.

Цель исследования.

Целью исследования является уточнение патогенного потенциала бактериальных сообществ палеонтологических и археологических памятников, расположенных в зоне многолетней (вечной) мерзлоты на основе анализа геномов культивируемых условно-патогенных палеобактерий.

Материалы и методы.

В ходе экспедиционных исследований, проведенных летом 2021 года в Усть-Янском и Верхнеколымском районах Республики Саха (Якутия) была сформирована коллекция образцов мерзлоты и биоматериала (34 образца), отобранная в участках, наиболее перспективных с точки зрения обнаружения древних патогенных или симбиотических микроорганизмов, в частности, пробы отобраны в районе Янского комплекса палеолитических стоянок, в местонахождении плейстоценовой фауны Бунге-Толль. Проведено секвенирование и выполнена функциональная аннотация геномов ряда штаммов бактерий, выделенных из собранных образцов древнего биоматериала. В частности, секвенированы и геномы *Citrobacter braakii* pit1 (GenBank Acc. № JALIGI000000000); *Exiguobacterium* sp. 17-1 (GenBank Acc. № JALIGJ000000000); *Hafnia paralvei* Mf1-1 (GenBank Acc. № JALIGK000000000); *Enterobacter asburiae* Mf1-3 (GenBank Acc. № JALIGL000000000); *Corynebacterium callunae* 2 (GenBank Acc. № JALIGM000000000).

Результаты и обсуждение. Установлено, что геномы древних штаммов *Citrobacter braakii* pit1; *Hafnia paralvei* Mf1-1; *Enterobacter asburiae* Mf1-3 располагают генетическими детерминантами, позволяющими колонизировать пищеварительный тракт млекопитающих. В частности, штамм *Citrobacter braakii* pit1 содержит оперон CFA, ответственный за продукцию фимбрий, оперон продукции этаноламина и утилизации пропандиола (метаболиты, формируемые кишечной микробиотой). Геном *Hafnia paralvei* Mf1-1 содержит остров колонизации (Widespread_colonization_island), оперон (островок) утилизации пропандиола и ряд сидерофоров (аэробактин, алкалинин), геном *Enterobacter asburiae* Mf1-3 — агглютинин RTX и оперон генов секреции VI типа, сидерофоры аэробактинового и энтеробактинового кластера. Данные факторы колонизации могут также принимать участие в биопленкообразовании и развитии инфекционного процесса. В то же время филогенетический анализ позволил установить взаимосвязи древних штаммов энтеробактерий (*Citrobacter braakii*, *Hafnia paralvei*, *Enterobacter asburiae*) семейства с современными представителями семейства *Enterobacteriaceae*, при этом генетические дистанции между современными и древними штаммами невелики.

Выводы. Учитывая, что изученные штаммы соответствуют критериям аутохтонности (т.к. все изоляты были выделены неоднократно из интактного палеонтологического материала в асептических условиях) можно предполагать отсутствие быстрых эволюционных преобразований в геномах изученных видов в пределах времени, соответствующего возрасту палеонтологических находок (поздний плейстоцен).

Результаты исследования подтверждают принципиальную возможность сохранения в многолетнемерзлых отложениях зоогенных бактерий, обладающих патогенным потенциалом.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *ACINETOBACTER BAUMANNII* ОТ ПАЦИЕНТОВ СТАЦИОНАРОВ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Янович О.О., Титов Л.П.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Республика Беларусь

Актуальность.

Acinetobacter baumannii относится к широко распространенным возбудителям нозокомиальных инфекций группы ESKAPE ассоциированных с оказанием медицинской помощи и обладающих высокой устойчивостью к антибиотикам. Множественно-резистентные к антибиотикам, включая карбапенемы, штаммы *A. baumannii* широко распространены в медучреждениях разных стран, что представляет существенную проблему здравоохранения.

Цель работы — изучить клональное разнообразие множественно-резистентных штаммов *A. baumannii*, выделенных от пациентов палат интенсивной терапии и отделений хирургии межучреждений Республики Беларусь.

Материалы и методы.

Материалом для исследования являлись 49 множественно-резистентных штаммов

A. baumannii, полученных от пациентов палат интенсивной терапии и отделений хирургии межучреждений Республики Беларусь в 2020-2021 гг.

Для исследования клонального разнообразия был использован метод мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) в соответствии с Оксфордской схемой. Секвенирование фрагментов ДНК проводили на приборе ABI

Prism 3500, с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по протоколам производителя. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности генов «домашнего хозяйства» обрабатывали с помощью программы Mega 8. Филогенетический анализ выполнен программой eBURST и PhyloViZ.

Результаты

Методом мультилокусного сиквенс-типирования было выявлено 11 сиквенс-типов *A. baumannii*, из них пять новых, которые были зарегистрированы в международной базе МЛСТ (СТ 2550, 2549, 2563, 2564, 2565). С наибольшей частотой встречались СТ 2550, СТ 231 и СТ 1282 — 44,9%, 20,4% и 12,2% соответственно. Как представлено в таблице 1 другие сиквенс-типы встречались реже.

Анализ, проведенный при помощи программы eBURST, позволил идентифицировать 4 клональных комплекса — CC109 (n=37), CC110 (n=1), CC92 (n=7) и CC944 (n=4).

С наибольшей частотой выявлялся комплекс CC109 (75,5%) в котором доминирующим генотипом был СТ2550 (59,4%). CC92 включал два сиквенс-типа. Клональный комплекс CC944 включал четыре изолята. Один изолят СТ299 принадлежал к CC110.

ТАБЛИЦА 1. СИКВЕНС-ТИПЫ ИЗУЧЕННЫХ ШТАММОВ *A. BAUMANNII*

СТ	СС	Число изолятов	%
229	110	1	2
231	109	10	20,4
441	109	3	6
450	92	1	2
1103	944	2	4
1282	92	6	12,2
2550	109	22	44,9
2549	109	1	2
2563	944	1	2
2564	944	1	2
2565	109	1	2

Анализ международной базы данных по штаммам, полученным из стран Европы и России проведенный с помощью программы PHYLOViZ показал, что большинство штаммов из Беларуси расположены на ветви где центральным был сиквенс-тип СТ-231, который является продуцентом карбапенемаз.

Распределение СТ и СС по регионам Беларуси показало, на территории страны доминирующим клональным

комплексом является CC109, относящийся к международному клону IC1. Также в большинстве областей циркулирует CC92, сиквенс-типы относящиеся к этому СС встречались с частотой 14,2%. Клон CC944 встречался в основном в южных областях республики.

Выводы.

Проведенный молекулярно-генетический анализ резистентных штаммов

А. baumannii, выделенных в РБ показал, что подавляющее большинство штаммов принадлежит клональной линии CC109, представленной 5 различными сиквенс-типами и относящейся к IC1. Отдельные клоны А. baumannii возникают и независимо эволюционируют на разных территориях, приобретая дополнительные конкурентные

преимущества, например, гены резистентности. Очевидно, что такие клоны могут распространяться как внутри страны, так и между странами. Для выявления изменений в эпидемиологии А. baumannii и для улучшения контроля за распространением бактерии необходим дальнейший молекулярно-эпидемиологический мониторинг.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СЕЗОННЫХ КОРОНАВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2017-2022 ГГ.

Мусаева Т.Д.¹, Комиссаров А.Б.¹, Фадеев А.В.¹, Писарева М.М.¹, Едер В.А.¹, Ксенафонтов А.Д.¹, Коржанова М.¹, Иванова А.А.¹, Киселева И.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «НИИ группа им. А.А. Смородиной» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. На сегодняшний день известны четыре сезонных коронавируса человека (HCoV), которые являются эндемичными во всем мире (229E, NL63, OC43 и HKU1). Геном коронавируса представлен односторонней линейной молекулой РНК положительной полярности размером 27–32 тыс. нуклеотидов. В результате рекомбинации РНК коронавируса разных видов могут появляться новые варианты, приобретающие нехарактерный тканевый тропизм и более высокую вирулентность. В Санкт-Петербурге заболеваемость, вызванная сезонными коронавирусами, в разные годы составляет от 0,7 до 5%. В городе ведется постоянный мониторинг сезонных коронавируса, однако глубокий генетический анализ не проводится. В связи с этим, целью данного исследования явился генетический анализ разнообразия сезонных коронавируса человека, циркулировавших на территории Санкт-Петербурга.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: провести скрининг носоглоточных мазков от госпитализированных пациентов на наличие или отсутствие генетического материала сезонных коронавируса; определить видовую принадлежность образцов, положительных на Alphacoronavirus или Betacoronavirus; провести их полногеномное секвенирование и осуществить филогенетический и аминокислотный анализ полученных последовательностей.

Материалы и методы. Был проведен скрининг 30659 образцов из верхних дыхательных путей с 2017-2022 гг. от пациентов с симптомами гриппа и ОРВИ в г. Санкт-Петербург. Для выявления вирусных антигенов методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени использовали тест-систему «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) по инструкции производителя на приборах для ПЦР с детекцией в режиме реального времени CFX96 (Bio-Rad, США). Полногеномную амплификацию проводили с помощью праймеров с использованием реагентов Биолабмикс-Премиум (Новосибирск). Высокопроизводительное секвенирование следующего поколения проводили на приборе DNBSEQ-G400 платформы MGI с использованием набора реагентов для секвенирования FCL SE 100. Прочтения были выровнены на референс с помощью про-

граммы BWA-MEM 2, конвертировали выравнивания в программе Samtools, консенсусную последовательность получали в программе Unipro Ugene. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовался алгоритм MAFFT. Построение филогенетических деревьев проводили в программе Ugene v45 методом ML, GTR+G.

Основные результаты. Была продемонстрирована особенность циркуляции различных видов сезонных коронавируса человека: сезонные коронавирусы циркулируют ежегодно и составляют 1,4-6,9 % от общего числа ОРВИ. Была продемонстрирована чередующаяся динамика циркуляции различных видов в зависимости от сезона. Так, Alphacoronavirus HCoV-NL63 доминировал в 2017-2018 гг. и 2019-2020 гг. Другой представитель этого же рода HCoV-229E доминировал в 2018-2019 гг. Betacoronavirus HCoV-OC43 преобладал в сезоны 2020-2022 гг.

Вирусы HCoV-229E, циркулировавшие в Санкт-Петербурге в 2018-2019 гг, принадлежат одной кладе с вирусами, циркулировавшими в Пекине в 2018 г. (Nan Shao et al., 2022), в Сиэтле (штат Вашингтон) в 2019 г., а также к мутантному вирусу из Танзании TZ/4033K/2017_C2R10_truncated с делецией 2704 в сайте RBD S-гена, что полностью ингибирует экспрессию шиповидного белка (Marcus G. Mah, et al., 2023). Вирусы эпидсезона 2020-2021 гг. близки к изолятам из США 2022 г. и Гонконга 2020 г. (Susanna K P Lau et al., 2021).

По результатам филогенетического анализа, Санкт-Петербургские изоляты HCoV-NL63 относились к трем генотипам: В, С2, С3. Вирусы HKU1 преимущественно принадлежали к генотипу А и генотипу В. Генотип В имеет больше замен, которые несут кумулятивный характер, как и HCoV-229E. Вирусы OC43 принадлежали преимущественно к генотипу К, J, что соответствует общемировой тенденции.

Заключение. Показано чередование в доминировании вида эндемичных коронавируса в зависимости от сезона. Определены генотипы вирусов, циркулирующих на территории Санкт-Петербурга. Так, вирусы HCoV-229E входят в формирующийся генотип, вирусы которого накапливают замены. HCoV-OC43 так же накапливает мутации

и формирует подлинию генотипа K, которая является доминирующей во всем мире. Наше исследование не только уточняет эпидемиологический профиль острых респираторных заболеваний, вызываемых HCoV, но и представ-

ляет данные по полногеномному секвенированию, что обогащает соответствующие информационные ресурсы и, несомненно, способствует лучшему пониманию эволюционных и эпидемиологических характеристик HCoVs.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ СЕМЕЙСТВА ECHO НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ У ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, ВЫЗЫВАЮЩИХ ТЯЖЕЛЫЕ СЛУЧАИ МУКОВИСЦИДОЗА У ДЕТЕЙ

Романова К.А.¹, Садеева З.З.², Лазарева А.В.², Гейдаров Р.Н.¹, Михайлович В.М.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия

² Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. *Pseudomonas aeruginosa* — одна из наиболее значимых условно-патогенных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, приводящих к летальному исходу у больных муковисцидозом. Микроорганизм вызывает рецидивы инфекции нижних дыхательных путей и хроническую бактериальную колонизацию, драматически снижая функцию легких. Штаммы возбудителя, продуцирующие посредством системы секреции T3SS токсины EhoS, EhoT, EhoU и EhoY, являются наиболее агрессивными, существенно ухудшают течение заболевания и играют одну из ключевых ролей в патогенезе муковисцидоза.

Эффекторные белки EhoS и EhoT обладают N-концевым GAP-доменом, участвующем в апоптозе клетки-хозяина, и C-терминальным ADPRT-доменом, который связан с ингибированием синтеза малых GTPаз, играющих важную роль в координации и поддержании актинового цитоскелета эукариотической клетки. EhoU активирует механизм скоротечной гибели клеток и является важным фактором вирулентности возбудителя. EhoY способствует нарушению узнавания бактерии иммунными клетками хозяина и работает как «дезорганизирующая» циклаза и вместе с EhoT обнаруживается у большинства штаммов *P. aeruginosa*.

Около 98% изолятов *P. aeruginosa* содержат гены системы T3SS, но большинство из них не кодируют полный набор указанных выше эффекторов. В частности, гены ehoS и ehoU обычно взаимоисключающие, а сочетание ehoS+/ehoU+ обнаруживается крайне редко в штаммах, не связанных с муковисцидозом. По данному признаку штаммы разделяют на «инвазивные» и «цитотоксичные». К цитотоксичным штаммам относятся PA103 и PA14, продуцирующие EhoU и EhoT, которые вызывают быструю некротическую гибель клеток-хозяев. К инвазивным относят штаммы PAK и PA01, продуцирующие EhoS, EhoT и EhoY. Эти штаммы приводят к более медленной каспазозависимой гибели клеток-хозяев и вызывают хроническую инфекцию у больных муковисцидозом.

Идентификация генетических детерминант токсичных эффекторов семейства Eho у пациентов с муковис-

цидозом представляется важной и актуальной задачей. Данные о наличии этих генов и их комбинаций позволяют спрогнозировать и определить тяжесть инфекции, а также на раннем этапе скорректировать терапию, предотвращая обострение заболевания.

Цель и задачи. Целью работы была разработка высокочувствительного метода идентификации генов вирулентности семейства eho на основе ПЦР у штаммов *P. aeruginosa*.

Материалы и методы. Были проанализированы 69 образцов бактериальной ДНК, выделенных из мокроты, крови, ликвора и аспирата больных муковисцидозом в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Выделение ДНК выполнялось набором DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Германия), согласно инструкции производителя.

Анализ образцов ДНК проводили методом симметричной ПЦР с последующей регистрацией продуктов амплификации электрофорезом в агарозном геле.

Основные результаты. Для специфичной амплификации фрагментов генов семейства eho был сконструирован набор олигонуклеотидных праймеров и проведена оптимизация условий ПЦР.

Сконструированные праймеры позволили специфически определять все 4 гена семейства eho: ehoS, ehoT, ehoU и ehoY. Разработанным методом была охарактеризована выборка из 69 образцов ДНК, выделенных из мокроты, крови, ликвора и аспирата больных муковисцидозом. По результатам ПЦР было установлено, что в изученной выборке преимущественно встречались штаммы с генами ehoS+/ehoU— (43,5%) и ehoS-/ehoU+ (30,4%). Комбинация двух генов ehoS+/ehoU+ идентифицирована в двух штаммах. Остальные 16 образцов (23,2%) содержали только гены ehoY и/или ehoT.

Заключение. Применение разработанного метода идентификации генов вирулентности семейства eho, основанного на полимеразной цепной реакции, позволит прогнозировать тяжесть течения заболевания, а также скорректировать индивидуальную терапию для пациентов с муковисцидозом.

АССОЦИАЦИЯ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ С ОДНОНУКЛЕОТИДНЫМ ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНОВ *IFNL3* И *IFNL4* У ЛИЦ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ОТ ГРИППА

Дедова А.В., Стучинская М.Д., Дедова Л.В., Николаева Л.И., Куприянов В.В., Мукашева Е.А., Крепкая А.С., Краснослободцев К. Г., Трушакова С.В., Бурцева Е.И.

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Грипп является самым распространённым инфекционным заболеванием. По оценкам ВОЗ, ежегодные эпидемии гриппа приводят к 3-5 миллионам случаев тяжелой болезни и до 650 000 смертельных исходов. Вакцинация против гриппа остаётся наиболее эффективным способом профилактики заболевания.

Актуальность данного исследования заключается в выявлении возможного влияния генетических факторов человека на эффективность вакцинации от гриппа. Есть сообщения о том, что, на эффективность вакцинации могут влиять однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T). Результаты исследования могут иметь практическое значение для развития персонализированной медицины.

Цель исследования — изучить возможность зависимости между интенсивностью иммунного ответа, оценённого по продукции цитокинов после вакцинации от гриппа, и ОНП генов *IFNL3* и *IFNL4*.

Материалы и методы. Выделение ДНК участников и анализ ОНП выполняли, используя наборы «Проба-Рapid-Генетика» и «ИммуноГенетика IL28В». Первичную клеточную культуру лимфоцитов из цельной крови участников получали по классической методике. Забор крови произведен на 4-6 неделю после введения вакцины «Ультрикс квадри» (Форт, Россия). Полученные лимфоциты стимулировали антигенами вакцины в дозах 0,15 мкг и 0,3 мкг. Отбор проб культуральной жидкости проводили на 2 и 6 сутки инкубации лимфоцитов с вакцинным антигеном. Определение продукции ИФН- γ , ИЛ-2 и ИЛ-4 выполняли, используя соответствующие наборы реагентов производителя «Вектор-БЕСТ» (Россия) для установления концентрации этих цитокинов в сыворотке крови человека.

Результаты. Участники исследования были разделены на группы в зависимости от генотипов по полиморфным

точкам генов *IFNL4* (rs12979860 C/T) и *IFNL3* (rs8099917 T/G): СС/ТТ — 3 участника, СТ/ТГ — 4 участника, ТТ/ГГ — 2 участника. Продукция ИФН- γ была максимальной на 6 сутки и постепенно увеличивалась от генотипа СС/ТТ (75 пг/мл), СТ/ТГ (108 пг/мл) к ТТ/ГГ (123 пг/мл). Снижение продукции ИФН- γ в группе лиц с генотипом СС/ТТ относительно участников с генотипом ТТ/ГГ составило 39%. Различия в продукции этого цитокина между участниками с разными генотипами не достигли статистической значимости. Вероятно, из-за малочисленности групп и индивидуальных колебаний. В настоящем исследовании получено, что продукция ИЛ-2 была максимальной на 2 сутки. Продукция этого цитокина в зависимости от генотипа участников имела следующие значения: при генотипе СС/ТТ — 27,5 пг/мл, при генотипе СТ/ТГ — 24,0 пг/мл, при генотипе ТТ/ГГ — 36,0 пг/мл. Снижение продукции ИЛ-2 в группе лиц с генотипом СС/ТТ относительно участников с генотипом ТТ/ГГ составило 24%. Достоверных различий между группами с разным генотипом нет. Возможно по причинам, указанным выше. При анализе продукции ИЛ-4 обнаружено, что содержание этого цитокина было максимальным на 6 сутки и составило в группе лиц с генотипом СС/ТТ 0,75 пг/мл, при генотипе СТ/ТГ — 2,0 пг/мл, при генотипе ТТ/ГГ — 1,0 пг/мл. Данных в пользу зависимости продукции ИЛ-4 от генотипа пока не получено.

Заключение/выводы. Сравнивая продукцию цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4 у лиц после вакцинации от гриппа, удалось обнаружить различия, ассоциированные с полиморфизмом генов *IFNL3* и *IFNL4*. Наибольшая продукция ИФН- γ и ИЛ-2 обнаружена у участников с генотипом ТТ/ГГ, наименьшая — у лиц с генотипом СС/ТТ. Однако различия не достигли статистической значимости из-за малого количества участников, что свидетельствует о необходимости продолжения исследований по оценке влияния генетического полиморфизма на эффективность вакцинации от гриппа.

IN SILICO АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ГЕНА *HLU* НА ФОРМИРОВАНИЕ Т-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ ЛИСТЕРИЛИЗИНА O – КАНДИДАТА В СУБЪЕДИНИЧНЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИСТЕРИОЗА

Лаврухин М.С., Ogлодина Д.Г., Кичемазова Н.В., Ляпина А.М., Ларионова О.С., Федорова В.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» (Вавиловский университет), Саратов, Россия

Введение. Вакцинопрофилактика инфекционных заболеваний — одно из значимых, доступных и эффективных медицинских мероприятий, реализуемых в борьбе с

инфекционными болезнями в мире. Однако изменяющиеся условия окружающей среды способствуют постоянно процессу изменчивости генома патогенов человека и

животных. Полиморфизм протективных антигенов микроорганизмов важно учитывать при разработке вакцинных препаратов. В современном мире предварительный компьютерный анализ (*in silico*) позволяет не только значительно ускорить разработку вакцин, но и оценить влияние изменчивости возбудителя на формирование протективных эпитопов, что важно для создания профилактических препаратов с широким спектром действия против новых штаммов и вариантов возбудителей. Листериоз — инфекционное заболевание пищевого происхождения, поражающее как людей, так и животных, уровень смертности которого может достигать 30% и выше. Листериоз продолжает оставаться одной из значительных проблем в области общественного здравоохранения, во многом, ввиду отсутствия специфических средств профилактики. Разработка последних является актуальной и нестандартной задачей, поскольку протективный иммунитет против листерий требует активации Т-клеточного иммунного ответа, в частности, цитотоксических лимфоцитов. *Listeria monocytogenes* (Lm) — возбудитель листериоза, факультативный внутриклеточный патоген, грамположительная бактерия, широко распространенная в окружающей среде и длительно сохраняющаяся в продуктах питания, в частности, продуктах животноводства, полученных от больных животных, употребление которых может вызвать заболевание у человека. Среди многочисленных факторов вирулентности Lm листериолизин-О (LLO), порообразующий белок, обеспечивающий выход бактерии из фагосомы в цитозоль и участвующий в распространении патогена из клетки в клетку, обладает наиболее выраженными иммуногенными свойствами и считается одним из основных протективных антигенов листерий. Перспективы создания вакцин против листериоза на основе LLO были показаны в ряде зарубежных работ.

Цель исследования. Изучить влияние вариабельности гена *hly*, кодирующего LLO, на формирование иммунных эпитопов возбудителя листериоза методами *in silico*.

Материалы и методы. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *hly* и соответствующих аминокислотных сиквенсов штаммов Lm зоонозного происхож-

дения, доступных в базе данных «BV-BRC» ($n = 10$), проводили с помощью виртуальных инструментов «EMBOSS Needle» и «Multalin». В качестве эталонного штамма использовали штамм Lm EGD-e, указанный как референтный в GenBank NCBI. Для иммунологической характеристики эпитопов использовали современные инструменты биоинформатического анализа на платформах ресурсов IEDB, dddg-pharmfac.net и webs.iitd.edu.in.

Результаты. При выравнивании нуклеотидных последовательностей гена *hly* десяти исследуемых штаммов Lm установлено, что каждая из них включает одинаковое число (1590) пар нуклеотидов. Однако при сравнении относительно референтного штамма выявлена выраженная вариабельность указанного гена, связанная с наличием определенного количества однонуклеотидных замен (SNP) — до 58 SNP в отдельных штаммах Lm. В свою очередь, при выравнивании аминокислотных сиквенсов белка LLO длиной 529 аминокислот каждая, была показана меньшая вариабельность аминокислотных последовательностей. Так, у четырех штаммов было обнаружено только шесть аминокислотных замен, у трех — три, а два штамма обладали 100% гомологией с референтной аминокислотной последовательностью LLO. Анализ CD8+ Т-клеточных эпитопов, предсказанных для вариабельных аминокислотных сиквенсов LLO, продемонстрировал отсутствие выраженных отличий их количественных (число уникальных и консервативных эпитопов (88,2%)) и качественных (аффинность к МНС I) характеристик.

Заключение. По данным *in silico* анализа, наличие вариабельных участков в аминокислотной последовательности белка LLO штаммов Lm зоонозного происхождения не оказывало выраженного влияния на формирование и основные характеристики Т-клеточных эпитопов. Превалирующее количество консервативных эпитопов подтверждает перспективу LLO как основы для разработки листериозных вакцин нового поколения, способных индуцировать иммунитет против штаммов возбудителя листериоза, обладающих выраженным полиморфизмом гена *hly*.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-16-00165.

Раздел 21. ТЕХНОЛОГИИ ВЫЯВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ И НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЧИН ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МОЛОДНЯКА

Калашников А.Е., Захаров В.М.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела Минсельхоза России, Москва, Россия

Актуальность. Крупный рогатый скот представляет собой удобную модель исследования долголетия и жизнеспособности молодых особей у млекопитающих. На данный объект исследований распространяются этические нормы, при этом он содержится в большом количестве, поэтому выборки исследований представительны, за скотом производится обязательное детальное ветеринарное наблюдение в течение всего цикла развития, что не сказать о человеке с системой добровольной диспансеризации. Биологический объект обладает внутривидовыми генетическими особенностями, сложившимися в течение многих поколений, что позволяет выявить наиболее четкие коррелятивные связи между отдельными фенотипическими признаками животных и аллелями В-локуса МНС крови, входящим в блоки сцепления с генами продуктивности.

Целью работы являлось исследование корреляции аллелей МНС с факторами жизнеспособности, которые измеряются в хозяйствах племязаводах.

Материалы и методы. Биологическим объектом исследований служили племенные животные холмогорской породы (величина выборок указана далее) племенного хозяйства «Ухта-97» республики Коми. В данном хозяйстве содержатся животные высокой генетической чистоты по происхождению в классических условиях среды производства. Исследования проводили посредством ветеринарного фенотипического наблюдения за молодыми животными обоих полов, а также при помощи иммунологических исследований. Для всех животных было подтверждено происхождение и отсутствие генетических врожденных аномалий при помощи молекулярно-генетических методов диагностики.

Результаты и обсуждение. Проведение анализа взаимосвязи генетических особенностей животных с жизнеспособностью скота проведено одновременно с рассмотрением генетической структуры стада и сопоставлением имеющихся данных с ранее проведенными исследованиями популяции. По полученным данным отмечается, что наибольшее распространение в группах с повышенной жизнеспособностью отмечается среди животных по аллелям МНС: O'Y2I', Y2A'B'Y', и A'2O'. Как показали результаты проведенных исследований, указанные аллели также занимают лидирующее положение в холмогорской породе. Выявлены ассоциации В-аллелей с жизнеспособностью молодняка: высокая (n=43) E3G'G', O', B'E'G' и низкая корреляции (n=29) O'E'3G'1 ($\chi^2=3,841$ и >) с частотами встречаемости 0,09, 0,04, 0,04, 0,02 и 0,1 соответственно.

Между тем можно подчеркнуть о существенном увеличении частоты встречаемости у животных с пониженной жизнеспособностью аллеля — O'E'3G'1 и напротив, в группе животных с высокой жизнеспособностью повышается частота встречаемости аллелей — E3G'G', O', и B'E'G'. При проведении дополнительных исследований оставшихся животных не исключено выявление и других аллельных вариантов, характеризующих каждую из исследуемых групп животных, а также улучшения характеристик (табл. 1). Между тем, значительное повышение частоты встречаемости аллеля O'E'3G'1, которая преобладает у животных с низкой жизнеспособностью, как оказалось из имеющейся базы данных привнесена в стадо быками-производителями голштинской породы скота.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫРАЩИВАНИЯ МОЛОДНЯКА

Год	Средняя живая масса по периодам развития						Общее число по стандарту	ж.м. 1-го осеменения
	Средняя живая масса, %							Средний случной возраст
	10 мес	отвечает ГОСТу	12 мес	отвечает ГОСТу	18 мес	отвечает ГОСТу		
2019	224	100	257	100	357	100	372	19
2020	224	100	257	100	341	100	358	19
2021	223	100	256	100	349	100	362	19
2022	223	100	257	100	350	100	360	19
+, — к 2020	-1	-	-1	-	8	-	4	-

В целях изучения имеющихся данных по показателям, в наибольшей степени определяющим жизнеспособность животных по фенотипическим показателям — продолжительности хозяйственного использования коров и их пожизненной продуктивности приведены показатели продолжительности хозяйственного использования коров и продуктивности по основным В-аллелям, достигающим для O'Y2I; E'2G'G'1, A'2O' и G'Y2E'2Q' 4,42-4,08 лактации при пожизненной продуктивности 29,13-27,62 т. (n=158).

Из результатов проведенного анализа полученных данных отмечается, что по продолжительности хозяйственного использования преимущество имеют коровы с аллелями O'Y2I; E'2G'G'1; A'2O'; G'1; G'Y2E'2Q'; QE'2Q'; D'E'2F'G'O'; G'O'; B'G2O'Y2 и другие. При этом у коров с этими аллелями получен и наиболее высокий уровень пожизненной продуктивности.

Грантовая поддержка обеспечена государственным заданием «Изучение влияния генных структур крови в детерминации повышенной жизнеспособности крупного

рогатого скота и разработка методов их использования в селекции животных на повышение жизнеспособности» — НИОКТР 122041900193-2 Министерства сельского хозяйства Российской Федерации за 2021-2022 гг.

Выводы. На основании вышеизложенного, в целях повышения эффективности селекционного процесса, рекомендуется осуществление иммунологического и генетического контроля коров племенного ядра стада при проведении мероприятий по закреплению быков-производителей учитывать не только молочную продуктивность, но и их иммуногенетические особенности. Одним из основных положений об иммунном статусе является наличие в организме естественных генетически детерминированных маркеров, по которым можно тестировать и прогнозировать резистентность. Логично предположить, что генетические маркеры должны иметь свойства, которые присущи генам ответственным за ключевые факторы иммунного ответа, с которыми животные рождаются, то есть они могут быть представлены генами МНС.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСОВ ГРИППА ПТИЦ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЧАЕК НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2023 ГОДУ

Грехнева А.Д., Андриясов А.В., Зиняков Н.Г., Овчинникова Е.В., Козлов А.А., Никонова З.Б., Гусева Н.А., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), Владимир, Россия

Введение. Высокопатогенный грипп птиц является особо опасным высококонтагиозным вирусным заболеванием домашних и диких птиц, характеризующимся поражением всех систем органов и крайне высокой летальностью (до 100%). Возбудитель заболевания — вирус гриппа птиц (ВГП) подтипов H5 и H7. Переносчиками ВГП являются преимущественно водоплавающие дикие птицы. При попадании в популяцию домашних птиц высоковирулентный вирус вызывает масштабные вспышки заболевания, требующие принятия срочных ветеринарно-санитарных мер: наложение карантина, убой и утилизации зараженной птицы, что влечёт за собой огромные экономические потери для сельскохозяйственных предприятий. Соответственно, для исследования эпизоотической ситуации большое значение имеет мониторинг высокопатогенного гриппа птиц, в особенности у диких водоплавающих птиц.

Целью данной работы являлось описание случаев выявления вирусов гриппа птиц в популяциях диких чаек на территории Российской Федерации в 2023 году и генетическая характеристика изолятов.

Материалы и методы. Постановку ОТ-ПЦР-РВ и классической ОТ-ПЦР проводили с использованием реагентов фирмы «СИНТОЛ» (Россия) с соответствующими системами праймеров и зондов для индикации ВГП типа А и для определения подтипов гемагглютинаина и нейраминидазы. Определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена HA подтипа H5 осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 с использованием наборов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), соглас-

но инструкции производителя. Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit (версия 7.0.5.3).

Результаты и обсуждение. На протяжении последних 4 лет на территории России наблюдается неблагоприятная ситуация по распространению высокопатогенного гриппа птиц. В 2020 и 2021 годах регистрировали вспышки заболевания, вызванные вирусами подтипов H5N8, H5N1 и H5N5. Начиная с 2022 года и до текущего момента выявляли вирусы гриппа птиц только подтипа H5N1. В период с начала мая по конец июля 2023 года был отмечен массовый падеж чаек на территории Приволжского, Центрального и Северо-Западного федеральных округов Российской Федерации. В общей сложности патологический материал от павших птиц поступил на исследование в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из 18 регионов в объеме 195 проб. В мае материал поступил из Калининградской, Новгородской, Московской, Смоленской, Тверской, Калужской, Костромской, Ивановской, Кировской и Нижегородской областей, Республик Удмуртия, Марий-Эл, Коми; в июне — из Костромской, Нижегородской, Владимирской, Тверской и Воронежской областей, Удмуртской Республики; в июле — из Костромской, Мурманской и Ленинградской областей, Пермского края, Республик Удмуртия и Коми. Во всех исследованных пробах был выявлен вирус гриппа птиц типа А подтипа H5N1. В течении августа 2023 года новых случаев гибели чаек от ВГП подтипа H5N1 не регистрировали.

После проведения сравнительного генетического анализа установили, что все изоляты от чаек принадлежат к азиатской генетической линии вирусов высокопатогенного

гриппа птиц подтипа H5 клады 2.3.4.4, которая к настоящему моменту получила широкое распространение в странах Азии, Европы, Африки и Америки. Сайт расщепления гемагглютинаина имеет структуру -REKRRKR-, характерную для высоковирулентных вирусов гриппа птиц. Согласно данным международных баз GISAID (EpiFlu) и GenBank, наиболее генетически близкими к данным изолятам являются вирусы подтипа H5N1, выявляемые с января 2023 года на территории ряда европейских стран — Чехии, Нидерландов, Бельгии, Англии, Австрии и Италии. При этом выявленные на территории Российской Федерации изоляты в целом демонстрировали сходство в 99,2-100% с европейскими изолятами вируса. Так же исследованные изоляты из РФ оказались близки к изолятам, выявленным на территории Египта и Испании в 2022 году с уровнем сходства до 99,6%.

Выявление ВГП преимущественно в северо-западных регионах европейской части Российской Федерации указывает на его занос с территории европейских государств во время весенней миграции птиц. Это подтверждает и высокий уровень сходства с вирусами гриппа птиц подтипа H5N1, выявленными в биологическом материале от домашней птицы из Калининградской области в апреле 2023 года. Не смотря на выявление ВГП подтипа H5N1 в начале года на территории Ставропольского края, Республики Дагестан, Астраханской и Херсонской областей, случаев гибели чаек от вируса гриппа птиц в южных регионах РФ не зарегистри-

ровано. Из «южных» регионов, где ВГП подтипа H5N1 был обнаружен у чаек, можно отметить только Воронежскую область. Хотя все вирусы, выявленные на территории РФ в 2023 году, принадлежат к генетической кладе 2.3.4.4b, массовая гибель среди чаек была зарегистрирована преимущественно в северо-западных регионах. Сложившаяся ситуация требует детального изучения биологических свойств выделенных вирусов. Зарубежными исследователями уже отмечено увеличение числа видов птиц, у которых выявляют вирус высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5N1. Особые опасения вызывают факты регистрации ВГП подтипа H5N1 у мертвых млекопитающих в дикой природе. Стоит отметить, что вспышке вируса гриппа птиц среди норок в Испании в 2022 году предшествовала эпизоотия среди птиц, которая также сопровождалась гибелью чаек.

Заключение. В пробах патологического материала от павших чаек, поступавших в лабораторию с начала мая по конец июля 2023 года, идентифицирован вирус гриппа птиц подтипа H5N1, который по результатам сравнительного генетического анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена HA отнесли к азиатской генетической линии высокопатогенных вирусов гриппа птиц подтипа H5 клады 2.3.4.4b. Массовая гибель чаек была отмечена преимущественно в северо-западных регионах европейской части Российской Федерации и была связана с миграцией диких птиц из Европы.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ СУБТИПА А/Н5N1, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2022 Г.

Онхонова Г.С., Косенко М.Н., Егорова М.Л., Васильцова Н.Н., Марченко В.Ю., Рыжиков А.Б.

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Россия

Введение. Вирус гриппа представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения во всем мире из-за способности вызывать эпидемии и пандемии. Заболеваемость и смертность от вируса гриппа остаются значимой проблемой для человечества, несмотря на постоянный контроль и совершенствование системы здравоохранения. Вирусы гриппа связываются с клетками, используя два основных поверхностных гликопротеина: гемагглютинин и нейраминидазу. Гемагглютинин позволяет вирусу прикрепляться к рецепторам сиаловой кислоты на поверхности клеток-мишеней, что является важнейшим начальным этапом для заражения. Вирусы гриппа птиц в основном связываются с сиаловыми кислотами типа $\alpha 2-3$, в то время как человеческие штаммы связываются с $\alpha 2-6$ сиаловыми кислотами. Нейраминидаза, с другой стороны, способствует высвобождению вновь образованных вирусных частиц из инфицированных клеток, помогая вирусу распространяться в организме. Эти взаимодействия между гликопротеинами вируса гриппа и рецепторами клетки-хозяина являются ключом к способности вируса к инфицированию и репликации. Понимание этих механизмов важно для разработки противовирусных препаратов

против гриппа и оценки пандемического потенциала циркулирующих вирусов гриппа на стыке вирусов животных и человека.

Цель и задачи исследования. Целью работы является изучение рецепторной специфичности штаммов вируса гриппа птиц субтипа А/Н5N1. Для достижения поставленной цели необходимо решение следующих задач: наработка штаммов вируса гриппа на развивающихся куриных эмбрионах; очистка полученных образцов; измерение и расчет равновесных констант диссоциации тестируемых штаммов вируса гриппа с аналогами клеточных рецепторов.

Материалы и методы. Культивирование штаммов вируса гриппа из биообразцов птиц проводили на развивающихся куриных эмбрионах. Аллантоисную жидкость, содержащую вирус, инактивировали β -пропиолактоном, далее очищали с помощью фильтрации и центрифугирования с финальной очисткой методом гель-фильтрации. Кинетику связывания вирионов с аналогами рецепторов исследовали методом биослойной интерферометрии на Octet RED96e (ForteBio) с аналогами рецепторов типа $\alpha 2-3$ — 3'-Sialyl-N-acetylactosamine (3'SLN) и типа $\alpha 2-6$ —

6'-Sialyl-N-acetylactosamine (6'SLN) (Lectinity). Равновесные константы диссоциации рассчитывали с помощью программного обеспечения ForteBio Data Analysis 12.0.

Основные результаты. В результате работы было изучено 23 штамма вируса гриппа птиц субтипа А/Н5N1 на предмет рецепторной специфичности. Были рассчитаны равновесные константы диссоциации с аналогами рецепторов 3'SLN и 6'SLN. Полученные данные показали, что исследуемые штаммы сохраняют доминирующую специфичность к рецепторам «птичьего» типа $\alpha 2$ -3.

Заключение. Количественное измерение рецепторной специфичности вируса гриппа необходимо для понимания факторов, влияющих на распространение вируса, что крайне важно для мониторинга зоонозных вариантов вируса гриппа. С помощью метода биослойной интерфе-

рометрии было изучено 23 штамма вируса гриппа птиц субтипа А/Н5N1, циркулировавших на территории Российской Федерации в 2022 году. Полученные равновесные константы диссоциации с аналогами рецепторов типа $\alpha 2$ -3 и $\alpha 2$ -6 показали, что выделенные в 2022 году штаммы вируса гриппа птиц не связываются с рецепторами типа $\alpha 2$ -6 и, соответственно, не взаимодействуют с клетками верхнего дыхательного тракта человека, что позволяет сделать вывод о низкой вероятности инфицирования человека. Тем не менее, постоянный контроль и мониторинг рецепторной специфичности циркулирующих штаммов вирусов гриппа животных необходимы для своевременного принятия мер защиты против пандемического гриппа. Работа выполнена за счет финансирования выполнения государственного задания ГЗ-13/21 из федерального бюджета.

СЛУЧАЙ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА Н9N2 В 2023 ГОДУ

Осипова О.С., Овчинникова Е.В., Жестков П.Д., Андриясов А.В., Зиняков Н.Г., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), Владимир, Россия

Введение. Вирусы гриппа птиц подтипа Н9N2 классифицируются как низковирулентные, однако при нарушении условий содержания сельскохозяйственных птиц и наличии ассоциированных заболеваний вызывают симптомы респираторной инфекции и снижение яйценоскости до 30%, у бройлеров отмечают увеличение падежа с 3-х недельного возраста. Вирус подтипа Н9N2 обладает пандемическим потенциалом, поскольку за счет реассортации претерпевает быструю эволюцию и может передаваться от птицы к человеку. К заражению восприимчивы многие млекопитающие, вирус выделяли от собак, свиней, лошадей, норок, хорьков, мышей и человека. Согласно литературным данным, подтип Н9N2 широко распространен в птицеводческих хозяйствах в странах Азии, Ближнего Востока и Северной Африки.

На территории Российской Федерации случаи выявления вируса подтипа Н9N2 регистрировали с 2012 г. в птицеводческих хозяйствах Амурской области и Приморского края. Выделенные вирусы принадлежали к генетической группе Y280. С 2019 г на территории Челябинской области и в Забайкальском крае обнаружили вирусы генетической группы G1. Отмечен случай выявления представителей группы Y439 в материале от дикой утки из Амурской области в 2018 г. Учитывая информацию о широком распространении вирусов Н9N2 и потенциальную опасность для человека, является актуальным изучение свойств вируса, выделенного в 2023 г.

Цель и задачи. Целью исследования явилось изучение биологических свойств выделенного в 2023 году вируса гриппа птиц подтипа Н9N2.

Материалы и методы. Выделение вируса проводили в 10-суточных свободных от патогенной микрофлоры куриных эмбрионах (СПФ-КЭ). Из биологического материала готовили 10-20% суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2-7,4) и вводили в аллантоисную полость СПФ-КЭ в объеме 0,2 см³. Эмбрионы инкубировали 48-72 ч, затем охлаждали и отбирали экстраэмбриональную

жидкость с целью выявления гемагглютинирующей активности. В случае положительной реакции (титр в РГА не ниже 1:16) осуществляли идентификацию вируса гриппа птиц (ВГП) в реакции торможения гемагглютинирующей активности (РТГА) с референтными сыворотками против ВГП подтипов Н1-Н16 (IZISVe, Италия). Реакцию проводили согласно рекомендациям Всемирной организации по охране здоровья животных и общепринятым методикам.

Выделение РНК. Выделение суммарной РНК осуществляли набором «РИБО-сорб» (кат. № К2-1-Et-100) согласно инструкции производителя.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). ОТ-ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР проводили согласно методическим рекомендациям.

Секвенирование. Определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена НА осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 с использованием наборов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя.

Нуклеотидные последовательности. В работе использованы нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов вирусов подтипа Н9, опубликованные в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) и платформу EpiFlu (<https://www.gisaid.org/>).

Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit, версия 7.0.5.3. Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы множественного выравнивания ClustalW.

Результаты. В ходе проведенных исследований в 2023 г в референтной лаборатории вирусных болезней птиц (ФГБУ «ВНИИЗЖ») зарегистрирован случай выявления низкопатогенного гриппа птиц у домашней птицы в Амурской области.

Суспензии проб патологического материала инокулировали 10-суточным СПФ-КЭ. Гибели эмбрионов не наблюдали в течение 72 ч. Гемагглютинирующая активность

(титр в РГА составил 1:256) была обнаружена в пробах суспензий экстраэмбриональной жидкости, отобранных от зараженных СПФ-КЭ. Идентификация в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) со специфическими сыворотками H1-N16 показала принадлежность выделенного инфекционного агента к подтипу H9.

В результате постановки ОТ-ПЦР-РВ в полученных пробах был выявлен генетический материал вируса гриппа птиц типа А, идентифицирован подтип H9N2.

Для филогенетического анализа был использован фрагмент нуклеотидной последовательности гена гемагглютинина (34-256 п.н. открытой рамки считывания (ОРС)). В результате анализа нуклеотидной последовательности гена HA было установлено родство выделенного вируса с группой изолятов, выявленных ранее на территории Китая, Дальневосточного ФО РФ и Таджикистана. Проведенный генетический анализ показал, что выделенный вирус в Амурской области входит в обширную генетическую группу Y280, основу которой составляют изоляты H9N2, выделенные на территории Китая с 1997 г. по 2022 г.

Ранее выявленные изоляты от домашних птиц в Приморском крае в 2018 году относились к группе Y280 и имели генетическое сходство (99-100%) с изолятами, выделен-

ными в Японии и Китае в 2013-2017гг. Выделенный вирус в 2023 году в Амурской области филогенетически имеет родство (около 99 %) с вирусами, выявленными в Китае в 2021-2022 гг.

Таким образом, в 2023 г был установлен факт заражения домашних птиц вирусом H9N2 в Дальневосточном ФО РФ в Амурской области. Литературные данные позволяют предположить, что вероятной причиной распространения вируса является занос указанного патогена из Китая, эндемичного по данному заболеванию. Следует отметить, что Амурская область граничит непосредственно с Китаем, являющимся лидером по количеству вспышек гриппа птиц подтипа H9N2.

Заключение. На территории Российской Федерации в различные годы выявлены вирусы гриппа птиц подтипа H9N2 генетических групп Y280, G1 и Y439. В Российской Федерации с 2012 г. выявляли вирусы генетической группы Y280, циркуляция которых в настоящее время отмечена в Китае, Японии, Камбодже, Индонезии, Мьянме и Вьетнаме. В период с 2019 г по настоящее время на территории РФ идентифицировали вирусы генетической группы G1. В 2023 г. вновь отмечен случай выявления вируса H9N2 генетической группы Y280.

ИЗОЛЯТЫ АДЕНОВИРУСА ПТИЦ, ВЫЯВЛЕННЫЕ НА ПТИЦЕФАБРИКАХ И ЛИЧНЫХ ПОДСОБНЫХ ХОЗЯЙСТВАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2022 И 2023 ГОДАХ

Козлов А.А., Зиняков Н.Г., Никонова З.Б., Овчинникова Е.В., Гусева Н.А., Грехнева А.Д., Щербакова Л.О., Волкова М.А., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), Владимир, Россия

Введение. Аденовирусы птиц (FAdV, *Fowl aviadenovirus*) относятся к роду *Aviadenovirus* семейства *Adenoviridae* и представляют собой безоболочечные икосаэдрические ДНК-содержащие вирусы. Род *Aviadenovirus* разделяют на 5 видов (A, B, C, D и E) по генетическим свойствам на основании рестрикционного анализа и на 12 серотипов на основании результатов перекрестной нейтрализации. Комплексный анализ позволил соотнести виды и серотипы FAdV следующим образом: FAdV-A (серотип 1), FAdV-B (серотип 5), FAdV-C (серотипы 4 и 10), FAdV-D (серотипы 2, 3, 9 и 11) и FAdV-E (серотипы 6, 7, 8a и 8b).

Представители большинства известных видов FAdV вызывают у птиц специфические заболевания: FAdV-A — эрозию желудка (gastric erosion, GE), FAdV-C — синдром гепатита-гидроперикардита (hepatitis hydropericardium syndrome, HHS), FAdV-D и FAdV-E — гепатит с тельцами-включениями (inclusion body hepatitis, IBH) с поражением почек и поджелудочной железы. Штаммы и изоляты FAdV-B являются исключением, их выявляли у кур с разнообразными патологическими признаками: артритом, теносиновитом, гепатитом с тельцами-включениями, аэросаккулитом, перикардитом, энтеритом, сердечной декомпенсацией, нефрозом. Угроза аденовирусной инфекции актуальна как для коммерческих птицефабрик, так и для личных подсобных хозяйств.

Методы молекулярной диагностики (ПЦР и филогенетический анализ фрагментов гена Нехон вируса) являются основным средством для выявления и дифференциации полевых изолятов аденовируса птиц.

Цель — выявление и дифференциация изолятов аденовируса птиц в образцах биоматериала из птицефабрик и личных подсобных хозяйств РФ в 2022 и 2023 гг.

Материалы и методы. ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили в амплификаторе Rotor-Gene Q (Qiagen) с использованием реагентов фирмы СИНТОЛ (10х ПЦР-Буфер-Б, 25мМ раствор MgCl₂, смесь дНТФ (концентрация каждого нуклеотида 25 мМ), SynTaq ДНК-полимераза) и системы праймеров и зондов для выявления и дифференциации изолятов аденовируса птиц. Определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Нехон осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 с использованием наборов BigDye (Applied Biosystems). Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы BioEdit.

Результаты и обсуждение. В период с января 2022 г. по август 2023 г. было исследовано 533 пробы биоматериала от кур, в 125 пробах была выявлена ДНК аденовируса птиц (таблица).

ТАБЛИЦА. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ИЗОЛЯТОВ АДЕНОВИРУСА ПТИЦ НА ПТИЦЕФАБРИКАХ (П/Ф) И ЛИЧНЫХ ПОДСОБНЫХ ХОЗЯЙСТВАХ (ЛПХ) РФ В 2022 И 2023 ГГ.

Год	Место отбора	Результат ПЦР-РВ (кол-во проб, исслед. / полож.)	Результат секвенирования и филогенетического анализа (кол-во проб)				
			Вид А	Вид В	Вид С	Вид D	Вид E
2022	П/ф (16 объектов)	185 / 47	9	21	5	4	12
2023	П/ф (10 объектов)	347 / 77	2	45	7	17	10
	ЛПХ (1 объект)	1 / 1	–	–	–	–	1

За указанный период исследований было выявлено 11 изолятов аденовируса птиц вида А, по результатам филогенетического анализа данные изоляты обладают 100% сходства со штаммами из США (CELO (Phelps (ATCC VR-432), 1949 г.), Китая (2016–2021 гг.), Германии (2011 г.), Польши (2011 г.) и Швеции (2016 г.).

Из 66 выявленных изолятов аденовируса птиц вида В 64 идентичны между собой на исследованном участке генома и обладают 100% сходства со штаммами и изолятами из Венгрии (2015–2019 гг.), Китая (2017 г.), Австрии (2014–2015 гг.), Франции (2015 г.), Германии (2018 г.) и США (1996 г.). При этом один (2022 г.) из оставшихся двух выявленных изолятов обладает 99,8% сходства (одна значимая нуклеотидная замена) с указанными 64 изолятами и, по-видимому, является их эволюционной формой, а другой изолят (2023 г.) обладает 99% сходства с ними и 100% сходства с изолятом из Украины (2013 г.).

Выявленные 12 изолятов аденовируса птиц вида С в результате филогенетического анализа можно разделить на 3 группы: 7 идентичных между собой на исследованном участке генома изолятов (2023 г.), обладающих 99,1% сходства со штаммом INT4-ATTENUATED-AG234 и изолятами MX-SHP95, FAdV-4/Falcon/North America и 98,73% сходства с изолятом Krasnodar (Россия, 2009 г.); 4 идентичных между собой изолята (2022 г.), обладающих 98,73% сходства со штаммом INT4-ATTENUATED-AG234 и изолятами MX-SHP95, Krasnodar (Россия, 2009 г.), FAdV-4/North America; 1 изолят (2022 г.), обладающий 99% сходства со штаммом FAdV/PA/Layer/27614/13 (США, 2014 г.) и 98% сходства со штаммом INT4-ATTENUATED-AG234 (Мексика, 1995 г.) и изолятами

MX-SHP95 (Мексика, 1995 г.) и FAdV-4/Falcon/North America.

Из 21 выявленного изолята аденовируса птиц вида D 18 изолятов обладают 100% сходства с изолятами из Саудовской Аравии (2015 и 2016 гг.), Китая (2009–2016 гг. и 2019–2022 гг.), Канады (2005 г.), Мексики (1995 г.) и Японии; 3 изолята (2022 и 2023 гг.) обладают 100% сходства с изолятом из Австралии (2018 г.) и 99,1% сходства со штаммом GX01 (Китай, 2020 г.).

В результате филогенетического анализа выявленных 23 изолятов аденовируса птиц вида E было установлено наибольшее генетическое разнообразие: 14 изолятов (2022 и 2023 гг.) обладают 100% сходства с изолятом FAdV/Chicken/Kurdistan (Ирак, 2021 г.); 4 изолята обладают 100% сходства со штаммами из Германии (2013 г.), Венгрии (2009 г.), США и изолятом FAdV-10/Falcon/North America; 2 изолята (один изолят выявлен на птицефабрике, а другой в ЛПХ) обладают 100% сходства со штаммами из Франции (2013 г.) и Испании (2011 г.); 1 изолят обладает 100% сходства с изолятами из Китая (2015–2016 гг. и 2019–2022 гг.) и Индии (2013 г.); 1 изолят обладает 99,62% сходства с изолятом FAdV/Chicken/Kurdistan (Ирак, 2021 г.); 1 изолят обладает 99,62% сходства со штаммом из Японии (1950–1960 гг.).

Заключение. В результате проведенных исследований с января 2022 г. по август 2023 г. в биоматериале от птиц из птицефабрик и ЛПХ РФ были выявлены изоляты аденовируса птиц всех 5 известных на данный момент видов (А, В, С, D и E), при этом показано наличие нескольких генетических вариантов изолятов одного вида (В, С, D и E). Выявлена циркуляция у птиц в одной и той же птицефабрике в течение одного года как изолятов вируса разных видов, так и разных генетических вариантов вируса внутри одного вида.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ У ЛОСЕЙ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Яцентюк С.П.^{1,2}, Красникова М.С.¹, Долинская К.Г.¹, Пчельников А.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

Введение. Согласно открытым данным Министерства экологии и природопользования лось (*Alces alces*) является самым многочисленным представителем семейства Оленьих (*Cervidae*) в Московской области. Численность лосей, по подсчетам, проведенным зимой 2022–2023 гг., превыси-

ла 14,5 тысячи особей. Свободноживущие животные являются объектами любительской охоты, лоси могут заходить в скверы и парки городов и выходить на автотрассы, где попадают в дорожно-транспортные происшествия. Отдельную опасность представляют инфицированные копытные,

выходящие в места выпаса скота. В этом случае они могут представлять угрозу заноса инфекционных возбудителей в животноводческие хозяйства.

Результаты исследований, опубликованные в научной литературе, показывают, что дикие жвачные копытные могут быть носителями вирусов, общих для диких и сельскохозяйственных животных, а также опасных для человека. Описаны случаи как массовой гибели оленей, так и субклинической формы инфекции, вызванной вирусами разных групп [1,2,3]. В последнее время дикие животные рассматриваются также как потенциальные источники или резервуары новых вирусных возбудителей, где вирусы могут сохраняться и изменяться [3-4]. Для выявления и изучения распространенности известных и выявления новых патогенов активно используются методы молекулярной диагностики.

Целью нашей работы было получение информации о встречаемости 13 вирусных патогенов в популяции лосей Московской области.

Материалы и методы. Исследовали биологический материал (кусочки легкого, сердца, печени, почки, фрагменты носовой перегородки и смывы со слизистой оболочки носовой полости) от 119 лосей, отстрелянных в 12 районах Московской области в рамках любительской охоты в 2020 — 2023 гг. Нуклеиновые кислоты выделяли с помощью наборов «РибоПреп» («АмплиСенс», Россия) и QIAamp Viral RNA Kit («Qiagen», Германия). Для получения кДНК использовали комплект реагентов «Реверта-L» («АмплиСенс», Россия).

Для выявления генетического материала герпесвируса крупного рогатого скота (КРС) 1 типа (BHV-1), ротавирусов группы А и вируса парагриппа-3 КРС использовали диагностические наборы реагентов для ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» производства «АмплиСенс» и «ВетФактор» (Россия). Присутствие генетического материала SARS-CoV-2, альфа- и гамма-герпесвирусов, пестивирусов, аденовирусов, кобувирусов, вирусов гепатита Е и респираторно-синцитиальной инфекции КРС оценивали в классической и «гнездовой» ПЦР с использованием собственных методик. Для проведения амплификации и детекции продуктов амплификации использовали реагенты производства «Евроген», «BelBioLab» и приборы: Терцик (ДНК-технология, Россия), CFX96 (Bio-Rad, США) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

Результаты. Генетический материал вируса SARS-CoV-2, вирусов респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота КРС, герпеса КРС 2, 4, 5 и 6 типов, кобувирусов и вирусов гепатита Е не был выявлен ни в одной из исследованных проб. Использование универсальных праймеров для выявления фрагментов генома альфагерпесвирусов и секвенирование полученных продуктов ПЦР позволило исключить присутствие в материале от лосей *Cervid herpesvirus 2* (CvHV-2) и *Elk herpesvirus 1* (ElkHV-1), вызывающих субклиническую инфекцию у оленей.

В образцах паренхиматозных органов трех лосей, отстрелянных в лесах городских округов Рузского, Ступино и Луховицы, выявили РНК ротавирусов. В одном образце животного, отстрелянного в г.о. Серпухов, детектировали

генетический материал вируса вирусной диареи КРС. В образцах четырех лосей из г.о. Орехово-Зуево, Клин и Ступино обнаружили ДНК вируса герпеса КРС 1 типа.

Содержание вирусов в образцах было невысоким, животные, являвшиеся объектами охоты, были клинически здоровыми, что подтверждено результатами осмотра туш ветеринарными специалистами.

Ни в одном из исследованных образцов от лосей не был выявлен генетический материал эпизоотически значимого вируса семейства *Adenoviridae* *Odocoileus adenovirus 1*, который стал причиной массовой гибели оленей в Северной Америке [5]. При этом в материале от четырех лосей, отстрелянных в разных районах, в ПЦР с праймерами на консервативный фрагмент генома аденовирусов был получен продукт амплификации ожидаемого размера. По результатам секвенирования было подтверждено наличие в образцах фрагмента генома вируса, идентичного *Roe deer adenovirus 1* (GenBank Sequence ID:ON936732.1), который был обнаружен впервые в 2022 году в материале от косули [6]. В нашем исследовании фрагмент вируса был выявлен в образцах смыва со слизистой, трахеи и носовой перегородки лосей. Вероятно, новый аденовирус может вызывать легкое течение респираторного заболевания у лосей и косуль.

После заражения монослоя перевиваемой культуры клеток почки телят (MDBK) материалом от одного из лосей был отмечен цитопатический эффект, а исследование методом ПЦР культуральной жидкости после первого пассажа подтвердило наличие ДНК *Roe deer adenovirus 1*. Исследования вируса будут продолжены.

Заключение. Результаты скрининговых ПЦР-исследований подтверждают информацию о циркуляции в популяции лосей Московской области вирусов, общих для оленей и крупного рогатого скота, а также показывают, что олени являются носителями собственных вирусных патогенов, значимость которых предстоит выяснить. Изучение встречаемости инфекционных агентов у свободноживущих животных в естественных популяциях является важным инструментом оценки рисков появления новых опасных патогенов и передачи инфекции между дикими и домашними животными, а также является необходимым для принятия мер по сохранению биологического разнообразия.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-26-00093, <https://rscf.ru/project/22-26-00093/>.

Список литературы.

1. Domshy K.A., Lung O., Nebroski M., Kruczkiewicz P., Ayilara I., Woods L.W., Lowe E., Davies J.L. Adenoviral hemorrhagic disease in a farmed elk (*Cervus canadensis*) in Alberta, Canada. *Can Vet J.* 2023 Jun;64(6):524-528.
2. Auer A., Schweitzer L., Kübber-Heiss A., Posautz A., Dimmel K., Seitz K., Beiglböck C., Riedel C., Rümenapf T. Porcine circoviruses and herpesviruses are prevalent in an Austrian game population. *Pathogens* 2022, 11, 305.
3. Feng A., Bevins S., Chandler J. et al. Transmission of SARS-CoV-2 in free-ranging white-tailed deer in the United States. *Nat Commun*, 2023, 14, 4078.
4. Cripps J.K., Pacioni C., Scroggie M.P., Woolnough A.P., Ramsey D.S.L. Introduced deer and their potential role in

disease transmission to livestock in Australia. *Mammal. Rev.* 2019; 49(1): 60–77.

5. Miller M.M., Cornish T.E., Creekmore T.E., Fox K., Laegreid W., McKenna J., Vasquez M., Woods L.W. Whole-genome sequences of *Odocoileus hemionus* deer adenovirus isolates from deer, moose and elk are highly conserved and

support a new species in the genus *Atadenovirus*. *J Gen Virol.* 2017 Sep;98(9):2320-2328.

6. Яцентюк С.П., Красникова М.С., Пчельников А.В. Изучение распространенности аденовирусов в популяциях диких парнокопытных московской области *Ветеринария, зоотехния и биотехнология.* 2022. № 10. С. 68-75.

СЛУЧАЙ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА Н9Н2

Осипова О.С., Овчинникова Е.В., Жестков П.Д., Андриясов А.В., Зиняков Н.Г., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), Владимир, Россия

Введение. Вирусы гриппа птиц подтипа Н9Н2 классифицируются как низковирулентные, однако при нарушении условий содержания сельскохозяйственных птиц и наличии ассоциированных заболеваний вызывают симптомы респираторной инфекции и снижение яйценоскости до 30%, у бройлеров отмечают увеличение падежа с 3-х недельного возраста. Вирус подтипа Н9Н2 обладает пандемическим потенциалом, поскольку за счет реассортации претерпевает быструю эволюцию и может передаваться от птицы к человеку. К заражению восприимчивы многие млекопитающие, вирус выделяли от собак, свиней, лошадей, норок, хорьков, мышей и человека. Согласно литературным данным, подтип Н9Н2 широко распространен в птицеводческих хозяйствах в странах Азии, Ближнего Востока и Северной Африки.

На территории Российской Федерации случаи выявления вируса подтипа Н9Н2 регистрировали с 2012 гг. в птицеводческих хозяйствах Амурской области и Приморского края. Выделенные вирусы принадлежали к генетической группе Y280. С 2019 г на территории Челябинской области и в Забайкальском крае обнаружили вирусы генетической группы G1. Отмечен единичный случай выявления представителей группы Y439 в материале от дикой утки из Амурской области в 2018 г. Учитывая информацию о широком распространении вирусов Н9Н2 и потенциальную опасность для человека, является актуальным изучение свойств выделенного вируса в 2023г.

Цель и задачи. Целью исследования явилось изучение биологических свойств выделенного вируса гриппа птиц подтипа Н9Н2.

Материалы и методы. Выделение вируса проводили в 10-суточных свободных от патогенной микрофлоры куриных эмбрионах (СПФ-КЭ). Из биологического материала готовили 10-20% суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2-7,4) и вводили в аллантоисную полость СПФ-КЭ в объеме 0,2 см³. Эмбрионы инкубировали 48-72 ч, затем охлаждали и отбирали экстраэмбриональную жидкость с целью выявления гемагглютинирующей активности. В случае положительной реакции (титр в РГА не ниже 1:16) осуществляли идентификацию вируса гриппа птиц (ВГП) в реакции торможения гемагглютинирующей активности (РТГА) с референтными сыворотками против ВГП подтипов Н1-Н16 (IZISVe, Италия). Реакцию проводили согласно рекомендациям Всемир-

ной организации по охране здоровья животных и общепринятым методикам.

Выделение РНК. Выделение суммарной РНК осуществляли набором «РИБО-сорб» (кат. № К2-1-Ет-100) согласно инструкции производителя.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). ОТ-ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР проводили согласно методическим рекомендациям.

Секвенирование. Определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена НА осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 с использованием наборов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя.

Нуклеотидные последовательности. В работе использованы нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов вирусов подтипа Н9, опубликованные в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) и платформу EpiFlu (<https://www.gisaid.org/>).

Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit, версия 7.0.5.3. Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы множественной выравнивания ClustalW.

Результаты. В ходе проведенных исследований в 2023 г в референтной лаборатории вирусных болезней птиц (ФГБУ «ВНИИЗЖ») зарегистрирован случай выявления низкопатогенного гриппа птиц у домашней птицы в Амурской области.

Суспензии проб патологического материала инокулировали 10-суточным СПФ-КЭ. Гибели эмбрионов не наблюдали в течение 72 ч. Гемагглютинирующая активность (титр в РГА составил 1:256) была обнаружена в пробах суспензий экстраэмбриональной жидкости, отобранных от зараженных СПФ-КЭ. Идентификация в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) со специфическими сыворотками Н1-Н16 показала принадлежность выделенного инфекционного агента к подтипу Н9.

В результате постановки ОТ-ПЦР-РВ в полученных пробах был выявлен генетический материал вируса гриппа птиц типа А, идентифицирован подтип Н9.

Для филогенетического анализа был использован фрагмент нуклеотидной последовательности гена гемагглютинаина (34-256 п.н. открытой рамки считывания

(ОРС)). В результате анализа нуклеотидной последовательности гена HA было установлено родство выделенного вируса с группой изолятов, выявленных ранее на территории Китая, Дальневосточного ФО РФ и Таджикистана. Проведенный генетический анализ показал, что выделенный вирус в Амурской области входит в обширную генетическую группу Y280, основу которой составляют изоляты H9N2, выделенные на территории Китая с 1997 г. по 2022 г.

Ранее выявленные изоляты от домашних птиц в Приморском крае относились к группе Y280 и имели генетическое сходство (99-100%) с изолятами, выделенными в Японии и Китае в 2013-2017 гг. Выделенный вирус в Амурской области филогенетически имеет родство (около 99 %) с вирусами, выявленными в Китае в 2021-2022 гг.

Таким образом, в 2023 г был установлен факт заражения домашних птиц вирусом H9N2 в Дальневосточ-

ном ФО РФ в Амурской области. Литературные данные позволяют предположить, что вероятной причиной распространения вируса является занос указанного патогена из Китая, эндемичного по данному заболеванию. Следует отметить, что Амурская область граничит непосредственно с Китаем, являющимся лидером по количеству вспышек гриппа птиц подтипа H9N2.

Заключение. На территории Российской Федерации выявлены вирусы H9N2 генетических групп Y280, G1 и Y439. В Российской Федерации с 2012 г. выявляли вирусы генетической группы Y280, циркуляция которых в настоящее время отмечена в Китае, Японии, Камбодже, Индонезии, Мьянме и Вьетнаме. В период с 2019 г по настоящее время на территории РФ идентифицировали вирусы генетической группы G1. В 2023 г. отмечен первый случай выявления вируса H9N2 генетической группы Y280.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К АДЕНОВИРУСУ ПТИЦ ВИДА В

Волкова М.А., Ярославцева П.С., Козлов А.А., Зиняков Н.Г., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.

Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), Владимир, Россия

Введение. Аденовирусы птиц (FAdV, Fowl aviadenovirus) — безоболочечные ДНК-содержащие вирусы являются возбудителями ряда инфекционных болезней птиц, которые могут наносить существенный экономический ущерб промышленному птицеводству. По генетическим характеристикам и антигенным свойствам выделяют 5 видов (A, B, C, D и E) и 12 серотипов (1-7, 8a, 8b, 9-11) аденовирусов птиц. К виду В аденовируса птиц относится только один серотип FAdV5. С целью серологической диагностики аденовирусных инфекций используют иммуноферментный анализ (ИФА). Lu H. с соавторами (2020) было установлено в ИФА наличие близкого антигенного родства между серотипами аденовируса, относящимися к одному виду, но не между видами, что позволяет выявлять видоспецифические антитела к аденовирусу птиц.

В течение 2022-23 гг. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в патологическом материале от птиц в 50 % положительных случаев был обнаружен геном аденовируса птиц вида В. Распространение аденовируса птиц данного вида в птицеводствах РФ послужило основанием для создания новых вакцинных препаратов, в связи с чем разработка метода выявления антител к аденовирусу птиц вида В является актуальной задачей.

Цель исследований — разработка тест-системы на основе непрямого ИФА для выявления антител, специфических к аденовирусу птиц вида В.

Материалы и методы. Выделение вируса из патологического материала от птиц проводили в первично-трипсинизированной культуре клеток печени эмбрионов кур с использованием среды ПСП (ФГБУ «ВНИИЗЖ») и 2% фекальной сыворотки.

ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили в амплификаторе Rotor-Gene Q (Qiagen) с использованием реагентов фирмы СИНТОЛ (10х ПЦР-Буфер-Б, 25мМ

раствор $MgCl_2$, смесь дНТФ (концентрация каждого нуклеотида 25 мМ), SynTaq ДНК-полимераза) и системы праймеров и зондов для выявления и дифференциации изолятов аденовируса птиц.

В качестве антигена для сенсibilизации планшетов использовали инактивированный очищенный культуральный материал аденовируса птиц вида В, концентрированный ультрацентрифугированием через слой 30 % сахарозы. Для постановки ИФА использовали общепринятую схему с небольшими модификациями. Исследуемые и контрольные сыворотки тестировали в разведении 1:400. Все компоненты в реакции добавляли в объёме 100 мкл, инкубировали при температуре 37°C. Буфер для разведения компонентов — 0,05 М трис-HCl буфер с 0,2 М NaCl, содержащий 0,1% твин-20 (pH 7,6) и 1% БСА. В качестве субстрата использовали раствор АБТС. Учёт реакции — спектрофотометрически при длине волны 405 нм.

Реакцию нейтрализации ставили по общепринятой методике.

Результаты. В результате проведенного комплекса исследований методами молекулярной диагностики в пробе патологического материала 62-суточных кур был идентифицирован аденовирус птиц вида В. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Нехон показал, что выявленный изолят имеет 100% сходство с изолятом WHRS, выделенном в 2017 году в Китае от уток 45 недельного возраста со вспышки синдрома снижения яйценоскости. Выявленный изолят был выделен на первично-трипсинизированной культуре клеток печени эмбрионов кур и использован для получения антигена с целью разработки тест-системы на основе ИФА.

Были оптимизированы условия постановки реакции ИФА. Рабочее разведение антигена и антикуриного иммунопероксидазного конъюгата (Synbiotics (США)) составило 1:200 и 1:500, соответственно. Для определения формулы расчёта титра антител при тестировании сывороток крови в одном рабочем разведении было исследовано в ИФА 100 сывороток крови кур с различным уровнем антител (в трёх повторностях). Уравнение зависимости между IgT, определённым методом последовательных разведений и Ig S/P, подсчитанным для каждой сыворотки в разведении 1:400, имело вид: $Ig T = 3,598 + 1,735 * Ig S/P$, коэффициент корреляции составил 0,9728.

Для объективной оценки иммунного ответа был установлен позитивно — негативный порог (ПНП). С этой целью исследовали 350 сывороток крови от клинически здоровых цыплят, не вакцинированных против аденовирусной инфекции. В качестве положительного и отрицательного контроля были взяты стандартные контрольные сыворотки. ПНП определяли путем расчета средних значений S/P отрицательных сывороток для разведения 1:400 и стандартного отклонения. Результат реакции считали отрицательным — при значении титра антител (Т) равном 300 и ниже; сомнительным — при Т — от 301 до 599 и положительным при значении Т — 600 и выше.

Специфичность антигена проверяли в ИФА с набором гетерологичных сывороток, в качестве которых использовали референтные сыворотки крови кур к вирусам инфекционных болезней (в том числе к аденовирусам птиц видов А, С, D и E) и микоплазмам птиц. Активность антигена аденовируса птиц с гетерологичными сыворотками не превышала фоновый уровень (реакция с неиммунной сывороткой).

Для сравнительной оценки чувствительности и специфичности разработанной тест-системы 22 пробы сыворотки крови от кур до и после заражения или иммунизации изолятом FAdV-B и специфическим антигеном аденовируса птиц, соответственно, тестировали в ИФА и РН. Во всех положительных пробах от заражённых и иммунизированных кур, статус которых был подтверждён в РН, были выявлены специфические антитела к FAdV-B. В пробах крови от здоровых кур специфические антитела не выявлены в обеих реакциях.

С помощью разработанной тест-системы ИФА было исследовано 510 проб сыворотки крови от кур разного возраста из двух птицефабрик (п/ф) РФ. Вакцинация против аденовирусной инфекции на птицефабриках не применялась (таблица).

ТАБЛИЦА. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СЫВОРОТОК КРОВИ КУР НА НАЛИЧИЕ АНТИТЕЛ К АДЕНОВИРУСУ ПТИЦ ВИДА В В ИФА

П/ф № п/п	Возраст птицы (дни)	Общее количество проб	Количество полож. проб	Средний титр антител по группе
1	200-400	90	0	20
2	38-66	180	0	47
	108	90	11	220
	120	60	4	203
	300-400	90	56	1175

Антитела к аденовирусу птиц вида В были обнаружены в сыворотках крови от кур из второй птицефабрики, в возрасте от 100 дней и старше; у взрослой птицы (300-400 дней) 62% проб были положительными.

Выводы. В результате проведённых исследований была разработана, валидирована и внедрена в диагности-

ческую практику тест-система на основе непрямого варианта ИФА для выявления антител к аденовирусу птиц вида В в сыворотках крови кур при тестировании в одном разведении. Показана возможность использования ИФА для проведения мониторинговых исследований по аденовирусной инфекции на территории РФ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТИРОВАНИЙ КОШЕК И СОБАК НА НОСИТЕЛЬСТВО МОНОГЕННЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ПРОВЕДЕННЫХ В ФГБУ «ВГНКИ» ЗА 2018-2022 ГГ.

Крылова Е.В., Путинцева А.В., Тимофеева И.А., Кирсанова Н.А., Осипова Ю.А., Солтынская И.В.

ФГБУ Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов («ВГНКИ»), Москва, Россия

Введение. Применение молекулярно-генетических исследований в разведении собак и кошек в настоящее время очень популярно и широко распространено. Наслед-

ственные заболевания обычно не диагностируются при рождении, имеют прогрессирующий характер и не поддаются лечению. Поэтому тестирование животных на носительство

наследственных заболеваний имеет большое значение при проведении селекционной работы и позволяет снижать частоту нежелательных мутаций в породе, т.е. позволяет заводчикам избегать разведения больных животных и получения носителей или больного потомства. Кроме того, выявление мутации, ассоциированной с заболеванием, необходимо для постановки диагноза конкретному животному.

В ФГБУ «ВГНКИ», начиная с 2007 года, разработаны и внедрены в практику Клинико-диагностического центра тридцать шесть молекулярно-генетических тестов для выявления носительства наследственных заболеваний, для определения групп крови и особенностей экстерьера (окрас, длина шерсти) чистопородных кошек и собак. Для выявления однонуклеотидных полиморфизмов и делеций/вставок одного-трёх нуклеотидов используется технология пиросеквенирования. Для диагностики мутаций, обусловленных протяженными делециями или вставками, применяются методики на основе ПЦР с электрофетической детекцией. Секвенирование по методу Сенгера используется для идентификации микроделеций и инсерций.

Цель. оценка встречаемости носителей мутаций, ассоциированных с моногенными наследственными заболеваниями, у кошек и собак различных пород.

Материалы и методы. Выделение ДНК из биологического материала (соскоб букального эпителия, венозная кровь) осуществляли сорбционным методом с использованием комплекта реагентов «ДНК-Сорб-С» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) с модификациями ФГБУ «ВГНКИ». ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Продукты ПЦР визуализировали в 1,8% агарозном геле, содержащем бромистый этидий, при помощи системы гель-документирования Infinity 1500/36M Xpress (Vilber Lourmat, Франция). Пиросеквенирование проводили на системе генетического анализа PyroMark Q96 MD (Qiagen, Германия). Секвенирование ДНК по Сенгеру осуществляли методом «cycle sequence» на амплификаторе «2720 Thermal Cycler», капиллярный электрофорез — на генетическом анализаторе «ABI Prizm 3130xl Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США).

Основные результаты. С помощью разработанных в ФГБУ «ВГНКИ» ДНК-тестов, за период 2018-2022 гг. было выполнено более 1000 исследований материала от собак и более 1500 исследований образцов от кошек. Наиболее часто проводили исследования на выявление мутаций, ответственных за развитие гипертрофической кардиомиопатии, дефицита пируваткиназы и поликистоза почек у кошек, прогрессирующей атрофией сетчатки у собак и кошек, первичного вывиха хрусталика и болезни Виллебранда I типа у собак.

На носительство гипертрофической кардиомиопатии (HCM) тестировались кошки породы мэйн кун и регдолл. С 2018 года было выявлено около 30% носителей мутации и 3% гомозигот по мутантному аллелю. Для HCM описан аутосомно-доминантный характер наследования с неполной пенетрантностью, т.е. наличие даже одного мутантного аллеля может оказаться достаточным для развития заболевания. HCM является одним из самых распространенных сердечных заболеваний, приводящих к внезапной смерти среди кошек молодого возраста.

Поликистозом почек (PKD) страдает около 6% кошек во всем мире, это аутосомно-доминантное заболевание значительно распространено среди персидских пород. В ФГБУ «ВГНКИ» исследовали пробы от животных персидской, сибирской, британской и экзотической короткошерстных пород, обнаружено 10% носителей, что соответствует мировым данным. PKD, как правило, характеризуется поздним началом и прогрессирующим двусторонним развитием кист, сопровождающимся увеличением размеров почек.

Дефицит пируваткиназы (PKdef) кошек это наследственная форма анемии, связанная с нестабильностью зрелых эритроцитов, которая встречается во многих породах. Среди протестированных животных было выявлено 3% гомозигот по мутантному аллелю (все были представителями породы мэйн кун) и 22% носителей мутации (мэйн кун, абиссинская, бенгальская, сибирская и сингапурская породы). Так как PKdef наследуется по аутосомно-рецессивному типу, то носитель является клинически здоровый. Но скрещивать такое животное, если оно представляет интерес для разведения, можно только с животным-гомозиготой по нормальному аллелю.

Прогрессирующая атрофия сетчатки — это группа заболеваний сетчатки глаза (PRAcord-1, PRA-prcd, PRA-rdAc), характеризуется дисплазией и/или дегенерацией палочек и колбочек, приводящих к развитию слепоты. PRA встречается как у кошек, так и у собак, наследуется чаще по аутосомно-рецессивному типу.

PRA типа cord1 характерна для миниатюрных такс. По результатам тестирования отмечается большое количество носителей мутации (41%) и гомозигот по мутантному аллелю (10%). Доля животных с нормальным генотипом составила 49%, что согласуется с данными других генетических лабораторий РФ.

PRA типа prcd распространенная среди собак многих пород. С 2018 года выявлено 26% носителей мутации, среди которых встречаются пудели различных ростовых категорий, английский и американский кокер-спаниели, китайская хохлатая собака. Доля больных животных — 1% (представители породы малый пудель).

PRA типа rdAc встречается у кошек. У 28% протестированных животных обнаружено носительство мутации (сомали, абиссинская, ориентальная породы).

Первичный вывих хрусталика (PLL) получил наибольшее распространение у терьеров и родственных им пород. PLL представляет собой смещение хрусталика из стекловидной ямки, что приводит к повышению глазного давления и повреждению глазного нерва и сетчатки. При отсутствии лечения животное слепнет. Было обнаружено 40% носителей мутации (пород мини-бультерьер, ягдтерьер, силихим-терьер и др.) и 3% больных животных (китайская хохлатая, бурятская собака).

Болезнь фон Виллебранда является наиболее часто встречающимся нарушением свертываемости крови у собак различных пород. Характерным симптомом являются кровотечения слизистых оболочек, внутренних органов. Наиболее часто в ФГБУ «ВГНКИ» проводились тестирования на носительство заболевания I типа, при котором наблюдается снижение нормального фактора Виллебранда до 10-20% от нормы. Выявлено 46% носителей (пород доберман, керри-блю-терьер, немецкий пинчер) и 7% гомозигот по

мутантному аллелю (керри-блю-терьер, доберман).

Заключение. Молекулярно-генетическое тестирование чистопородных кошек и собак на наличие мутаций, отвечающих за развитие наследственных заболеваний, помогает вести успешную селекцию, не прибегая к анали-

зирующему скрещиванию. Повышение генетического потенциала животных может быть обеспечено, например, введением обязательных проверок производителей на соответствующие породе моногенные наследственные заболевания с внесением записи в родословную.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ИЗОЛЯТОВ ОСПЫ ОВЕЦ НА ТЕРРИТОРИИ РФ 2018-2023ГГ.

А.О.Кротова, К.А. Шалина, О.П.Бьядовская, И.А.Чвала, А.В.Спрыгин

Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), Владимир, Россия

Введение. Вирус оспы овец (SPPV) (роду *Capripoxvirus*) — этиологический агент экономически значимого заболевания — оспы овец, notiфицируемого Всемирной организацией охраны здоровья животных (ВОЗЖ, ВОАН) с последующим наложением длительного карантина и вакцинацией.

Клинически оспа овец проявляется выделениями из носа, глаз, развитием на коже характерных оспенных поражений, а также эрозий на слизистых оболочках животного. Очаги поражения вызывают необратимые повреждения кожных покровов превращаясь в рубцы и ухудшая качество шерсти. Заболевание оспой овец характеризуется высокой смертностью животных.

В странах, неблагополучных по оспе овец, вакцинация гомологичной вакциной против SPPV является эффективной стратегией в борьбе с распространением болезни. Однако использование живых аттенуированных вакцин требует применения специализированных методов для дифференциации инфицированных и вакцинированных животных.

Коммерческие живые аттенуированные вакцины на основе различных штаммов доступны во всем мире. Югославский штамм «RM65» оспы овец широко используется на Ближнем Востоке, в Азии и на Африканском континенте, а румынский штамм «Fanaг» — в Индии и странах Магриба. В отличие от этого, Российская Федерация (РФ) и страны СНГ используют штамм «НИСХИ» оспы овец в кампаниях по вакцинации.

Цель работы: проведение исследований проб биологического материала, полученного со вспышек оспы овец в 2018-2023гг. с применением методики на основе ПЦР-РВ с анализом пиков плавления высокого разрешения (HRM-анализом), способной дифференцировать вакцинный штамм «НИСХИ» оспы овец от вирулентных изолятов вируса оспы овец дикого типа.

Материалы и методы. При поиске локуса в гене, кодирующем субъединицу РНК-полимеразы RPO132, был идентифицирован уникальный однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 109 536 генома штамма «НИСХИ», способный различать вирулентные штаммы оспы овец дикого типа и вакцинный штамм «НИСХИ». Праймеры были разработаны с использованием «CLC Qiagen Workbench v.21» для амплификации области 109 п.н.

Восемь вирулентных изолятов SPPV, выделенных со вспышек в РФ 2018-2022гг, были использованы для разработки ПЦР-РВ HRM для дифференциации вакцинных и полевых изолятов оспы овец.

Вирусную ДНК выделяли в соответствии с протоколом экстракции фенол-хлороформом (Sambrook and Russell, 2002).

ПЦР-РВ проводили в программируемом амплификаторе «Rotor-Gene Q5 plex HRM» (Qiagen) с использованием генспецифичных праймеров и коммерческого набора «SsoFast™ EvaGreen® Supermix» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с начальной стадией денатурации при 98°C в течение 2 мин, с последующими 40 циклами при 95°C в течение 5 с, 60°C в течение 20 сек. Затем продукт ПЦР денатурировали при 95°C в течение 30 с, охлаждали до 65°C в течение 60 с и плавляли от 65°C до 90°C с повышением температуры на 0,1°C каждые 2 секунды при непрерывном сборе данных.

Очищенную ДНК в количестве 200 нг фрагментировали с использованием ультразвукового аппарата

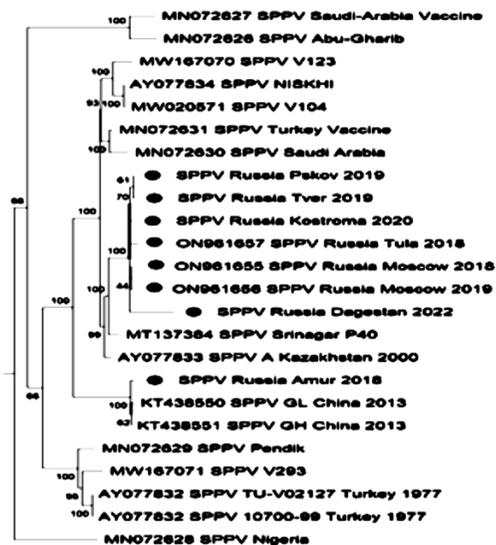


Рисунок 1 — Филогенетическое дерево демонстрирующее связь между доступными в настоящее время последовательностями вируса оспы овец из GenBank и проведенного исследования (выделены жирным маркером)

«Covaris ME220» (Covaris, LLC, Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями производителя на фрагменты размером от 100 до 700 п.н., причем большинство из них имели размер от 250 до 300 п.н. Затем 300 п.н. фрагментов были выборочно очищены с помощью магнитных частиц технологии SPRI для селективной очистки ДНК (Raisol Bio, Россия), и 25 нг ДНК обработано в соответствии с протоколом MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (MGI Tech, Китай). Платформа DNBSEQ-G400 (Magitech), протокол парного и 150-кратного секвенирования использовались для генерации наборов данных, содержащих от 10 до 100 миллионов парных считываний на выборку.

Результаты. Анализ кривых плавления с высоким разрешением (HRM-анализ), направленный на дифференциацию полевых изолятов оспы овец от вакцинного штамма «НИСХИ», показал, что средняя температура плавления проб ДНК, выделенных из полевых изолятов вируса оспы овец колеблется от $75,41 \pm 0,06^\circ\text{C}$ до $75,9 \pm 0,1^\circ\text{C}$, в то время как средняя температура плавления образцов ДНК вакцинного штамма составляет $76,46 \pm 0,12^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$).

Апробацию тест-системы проводили на изолятах со вспышек 2018-2022, которые согласно данным полногеномного секвенирования относились к группе полевых изолятов (рис. 1).

Согласно полученным данным с помощью ПЦР-РВ HRM полученные значения температур плавления для изолятов вируса оспы овец 2018-2022 соответствовали генетическим сигнатурам дикого типа — полевым изолятам.

Дополнительно проведены ПЦР-исследования в 2023 г. со вспышек оспы овец во Владимирской и Астраханской областях и также показано, что все выявленные изоляты относятся к полевой группе, таким образом показав, что вакцина против оспы овец штамма «НИСХИ» (ФГБУ ВНИИЗЖ) безопасна для применения.

Выводы. Таким образом, разработанная тест-система на основе ПЦР-РВ с применением HRM-анализа кривых плавления ДНК является надежным инструментом в дифференциации вакцинного штамма «НИСХИ» от полевых изолятов.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ СУБТИПА А/Н5N1, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2022 Г.

Онхонова Г.С., Косенко М.Н., Егорова М.Л., Васильцова Н.Н., Марченко В.Ю., Рыжиков А.Б.

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Россия

Введение. Вирус гриппа представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения во всем мире из-за способности вызывать эпидемии и пандемии. Заболеваемость и смертность от вируса гриппа остаются значимой проблемой для человечества, несмотря на постоянный контроль и совершенствование системы здравоохранения. Вирусы гриппа связываются с клетками, используя два основных поверхностных гликопротеина: гемагглютинин и нейраминидазу. Гемагглютинин позволяет вирусу прикрепляться к рецепторам сиаловой кислоты на поверхности клеток-мишеней, что является важнейшим начальным этапом для заражения. Вирусы гриппа птиц в основном связываются с сиаловыми кислотами типа $\alpha 2-3$, в то время как человеческие штаммы связываются с $\alpha 2-6$ сиаловыми кислотами. Нейраминидаза, с другой стороны, способствует высвобождению вновь образованных вирусных частиц из инфицированных клеток, помогая вирусу распространяться в организме. Эти взаимодействия между гликопротеинами вируса гриппа и рецепторами клетки-хозяина являются ключом к способности вируса к инфицированию и репликации. Понимание этих механизмов важно для разработки противовирусных препаратов против гриппа и оценки пандемического потенциала циркулирующих вирусов гриппа на стыке вирусов животных и человека.

Цель и задачи исследования. Целью работы является изучение рецепторной специфичности штаммов вируса гриппа птиц субтипа А/Н5N1. Для достижения по-

ставленной цели необходимо решение следующих задач: наработка штаммов вируса гриппа на развивающихся куриных эмбрионах; очистка полученных образцов; измерение и расчет равновесных констант диссоциации тестируемых штаммов вируса гриппа с аналогами клеточных рецепторов.

Материалы и методы. Культивирование штаммов вируса гриппа из биообразцов птиц проводили на развивающихся куриных эмбрионах. Аллантоисную жидкость, содержащую вирус, инактивировали β -пропиолактоном, далее очищали с помощью фильтрации и центрифугирования с финальной очисткой методом гель-фильтрации. Кинетику связывания вирионов с аналогами рецепторов исследовали методом биослойной интерферометрии на Octet RED96e (ForteBio) с аналогами рецепторов типа $\alpha 2-3$ — 3'-Sialyl-N-acetylactosamine (3'SLN) и типа $\alpha 2-6$ — 6'-Sialyl-N-acetylactosamine (6'SLN) (Lectinity). Равновесные константы диссоциации рассчитывали с помощью программного обеспечения ForteBio Data Analysis 12.0.

Основные результаты. В результате работы было изучено 23 штамма вируса гриппа птиц субтипа А/Н5N1 на предмет рецепторной специфичности. Были рассчитаны равновесные константы диссоциации с аналогами рецепторов 3'SLN и 6'SLN. Полученные данные показали, что исследуемые штаммы сохраняют доминирующую специфичность к рецепторам «птичьего» типа $\alpha 2-3$.

Заключение. Количественное измерение рецепторной специфичности вируса гриппа необходимо для пони-

мания факторов, влияющих на распространение вируса, что крайне важно для мониторинга зоонозных вариантов вируса гриппа. С помощью метода биослойной интерферометрии было изучено 23 штамма вируса гриппа птиц субтипа А/Н5N1, циркулировавших на территории Российской Федерации в 2022 году. Полученные равновесные константы диссоциации с аналогами рецепторов типа $\alpha 2-3$ и $\alpha 2-6$ показали, что выделенные в 2022 году штаммы вируса гриппа птиц не связываются с рецепторами типа $\alpha 2-6$

и, соответственно, не взаимодействуют с клетками верхнего дыхательного тракта человека, что позволяет сделать вывод о низкой вероятности инфицирования человека. Тем не менее, постоянный контроль и мониторинг рецепторной специфичности циркулирующих штаммов вирусов гриппа животных необходимы для своевременного принятия мер защиты против пандемического гриппа. Работа выполнена за счет финансирования выполнения государственного задания ГЗ-13/21 из федерального бюджета.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *HELICOBACTER* У СВИНЕЙ

Нургалиев Ф.М.¹, Х.Х. Гильманов²

¹ ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ

² ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

Введение. В свиноводческой отрасли принято считать, что среди незаразных болезней желудочно-кишечного тракта свиней большое распространение получили гастриты и язвенная болезнь желудка свиней, которые вызывают большой экономический ущерб. Возникновение этих заболеваний в основном связывают с нарушениями в кормлении, стрессами, нарушениями гомеостаза организма и отравлениях. Однако патогенез язвенной болезни желудка у свиней в значительной мере не изучен. Ряд авторов указывает, что у свиней определенную роль в патогенезе гастритов и язвенной болезни желудка могут играть бактерии рода *Helicobacter*.

Цель и задачи. В данной работе была поставлена цель провести индикацию бактерий рода *Helicobacter* у свиней с последующей идентификацией видов.

Материалы и методы. Биоматериал для исследования отбирали из фундального отдела желудков откормочных свиней в возрасте 8-10 месяцев, полученных в условиях убойного пункта (к забою допускали только клинически здоровых животных). Животные поступили с крупного свиноводческого комплекса Республики Татарстан. Все полученные образцы (20 проб) были взяты из желудков с патологоанатомическими признаками гастрита и язвенной болезни свиней.

Экстракцию ДНК проводили с использованием набора реагентов «РИБО-преп» производства ФБУН ЦНИИЭМ Эпидемиологии Роспотребнадзора в соответствии с инструкцией производителя.

Для индикации бактерий рода *Helicobacter* использовали образцы ДНК для выделения фрагмента 16S рНК размером 398 п.н. Родоспецифичную амплификацию хеликобактерий проводили, используя праймеры C97 GCTATGACGGGTATCC и C98 GATTTTACCCCTACACCA, предложенных коллективом авторов Fox J.G. и др [1]. Режим термоциклирования: 94 0С — 4 мин; 94 0С — 30 сек; 54 0С — 90 сек; 72 0С — 60 сек на 35 циклов. Изотерма: 72 0С — 300 сек.

Для идентификации вида *H. pylori* определяемыми фрагментами ДНК являлись гомологичные участки гена 23S рНК размером 267 п.н. Видоспецифическую амплификацию проводили, используя прай-

меры НPY 5 AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC и НPY А CGCATGATATCCCATAGCAGT, предложенных коллективом авторов А. Menard и др [2]. Режим термоциклирования: 94 0С — 4 мин; 94 0С — 60 сек; 55 0С — 60 сек; 72 0С — 60 сек на 40 циклов. Изотерма: 72 0С — 300 сек.

Для идентификации вида *H. suis* определяемыми фрагментами ДНК являлись гомологичные участки гена размером 150 п.н. Видоспецифическую амплификацию проводили, используя праймеры BFHsuis_F1 AAAACAMAGGCGATCGCCCTGTA и BFHsuis_R1 TTTCTTCGCCAGGTTCAAAGCG, предложенных коллективом авторов F. Cortez Nunes и др [3]. Режим термоциклирования: 94 0С — 4 мин; 95 0С — 20 сек; 60 0С — 30 сек; 72 0С — 30 сек на 40 циклов. Изотерма: 72 0С — 240 сек.

Для идентификации вида *H. rappini* определяемыми фрагментами ДНК являлись гомологичные участки гена ureB размером 101 п.н. Видоспецифическую амплификацию проводили, используя праймеры F1-ureB-rappini GATGATTAGGGCGACACAGC и R2-ureB-rappini CCCCAGATTCTATCTGCTTACTC, предложенных коллективом авторов M. Rocha Fox J.G. и др [4]. Режим термоциклирования: 94 0С — 4 мин; 94 0С — 30 сек; 60 0С — 60 сек; 72 0С — 10 сек на 40 циклов. Изотерма: 72 0С — 300 сек.

Детекцию амплифицированных фрагментов осуществляли путем их электрофоретического разделения в 2%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия и флуоресцентной визуализацией в виде светящихся полос под действием ультрафиолетового света. Результаты документировали с помощью фотосистемы.

Основные результаты. Проведенная индикация бактерий рода *Helicobacter* молекулярно-генетическим методом в пробах, полученных с фундального отдела желудков свиней, показала, что в 17 пробах обнаруживали ДНК этих микроорганизмов. Эти образцы были подвергнуты дальнейшему исследованию на видовую принадлежность. В результате проведенных исследований ДНК бактерий *H. pylori* в испытуемых образцах не обнаружили, во всех 17 пробах обнаружили ДНК *H. suis*, в 2 пробах обнаружили ДНК бактерий *H. rappini*.

Заключение. Полученные данные указывают на наличие колонизации фундального отдела слизистой оболочки желудка бактериями рода *Helicobacter* свиней с патологоанатомическими признаками гастрита и язвенной болезни желудка. Причём в большинстве случаев нами была выделена ДНК *H. suis* — 85% проб, ДНК бактерий *H. rappini* выделены в 10% проб, ДНК бактерий *H. pylori* не обнаружили.

Список использованной литературы:

1. Fox J.G. et al. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis // *Gastroenterology*. — 1998. — Vol. 114. — P. 755–763.

2. Ménard A. et al. PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the 23S rRNA gene, associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2002. — Vol. 46. — P. 1156–1157

3. Cortez Nunes F. et al. Presence of *Helicobacter pylori* and *H. suis* DNA in Free-Range Wild Boars // *Animals*. — 2021. — Vol. 11. — №. 5. — P. 1269.

4. Rocha M. et al. Association of *Helicobacter* species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma // *Gut*. — 2005. — Vol. 54. — P. 396–401.

АНАЛИЗ ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНОГО УЧАСТКА ГЕНА VP2 ИЗОЛЯТА ДИКОГО ТИПА ВИРУСА БОЛЕЗНИ ГАМБОРО

Толькова Е.С., Шепелева О.А.

ООО Научно-испытательный центр «ЧЕРКИЗОВО», Москва, Россия

Введение. Вирус болезни Гамборо — РНК-содержащий вирус семейства *Birnaviridae*, вызывающий инфекционную бурсальную болезнь (ИББ) у молодняка кур. У 3-6 недельных птиц вирус может вызывать тяжелое острое заболевание, характеризующееся высокой смертностью. В более раннем возрасте распространены менее острые и субклинические инфекции. В литературных источниках описаны два серотипа вируса ИББ, из которых только первый вызывает клинические признаки. Согласно всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) высоковирулентные штаммы серотипа 1 вируса ИББ распространены по всему миру.

Важной составляющей современной лабораторной диагностики вирусных заболеваний является секвенирование, так как данный метод позволяет оценить вариабельность присутствующих на площадке вирусов, отличить вакцинный штамм от изолятов «дикого» типа, в некоторых случаях — также дать оценку патогенности штамма. Так, для вируса болезни Гамборо чаще всего анализируют частичную последовательность гена VP2.

При анализе получаемых сиквенсов также важную оценку составляет доступный перечень ранее секвенированных последовательностей, с которыми можно проводить сравнение. Для РНК-содержащих высоковариабельных вирусов постоянное пополнение подобных баз данных является первоочередной задачей для обеспечения дальнейшей возможности получать достоверную и значимую информацию при подобной аналитической работе.

Цель и задачи. Целью исследования было секвенирование и оценка генетической вариабельности изолята «дикого» типа болезни Гамборо.

Материалы и методы. Последовательности вариабельного участка гена VP2 были получены при секвенировании двух образцов отпечатков органов кур на ФТА-картах. Образцы были отобраны с одной площадки в России в январе 2023 года от молодняка птицы в возрасте 26 (образец №1) и 33 дня (образец №2). Присутствие ви-

руса болезни Гамборо предварительно было подтверждено постановкой ПЦР в реальном времени набором реагентов «ПЦР-ГАМБОРО-ФАКТОР» (ООО «ВЕТ ФАКТОР»). Для образцов были получены значения Ct 18,5 (образец №1) и 30,3 (образец №2).

Выделение РНК было произведено набором «МАГНО-сорб» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии) с модифицированным протоколом на приборе KingFisher FLEX (Thermo Fisher Scientific). Элюат был дополнительно очищен набором RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen). Синтез кДНК осуществлялся набором «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии) согласно инструкции производителя. Постановка ПЦР проводилась с использованием реакционной смеси qPCRMix-HS (Евроген) согласно инструкции производителя, для секвенирования использовалось сочетание ранее опубликованных праймеров — прямого праймера согласно doi: 10.1016/j.ijvsm.2014.02.004 и обратного 1331-R согласно doi:10.1007/s00705-017-3500-4. Амплификация проводилась при температуре отжига 58°.

Секвенирование осуществлялось на генетическом анализаторе AB3500 (Thermo Fisher Scientific), для подготовки образцов к секвенированию были использованы наборы ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent, BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, BigDye XTerminator™ Purification Kit (все реагенты — Thermo Fisher Scientific; все манипуляции с образцами осуществлялись согласно инструкциям производителя).

Анализ результатов производился с использованием программного обеспечения CLC Main Workbench (Qiagen).

Основные результаты. Для обоих образцов были получены сиквенсы вариабельного участка гена VP2 длиной около 600 п.н. Выравнивание сиквенсов с вакцинными штаммами (V877, MB, Winterfield 2512) продемонстрировало значительное отличие полученного сиквенса (идентичность гипервариабельного участка 84,3–91,9%). Сиквенсы затем были проанализированы с помощью сер-

веса BLAST, где единственным близким сиквенсом (идентичность >94%) в базе данных GenBank оказался изолят RU/AC-26757/01/2019 (MT050440.1). Данный изолят был выделен в России в 2019 году, однако дополнительная информация по анализу данного изолята отсутствует.

Далее сиквенсы, полученные в данном исследовании, сравнили с аналогичными сиквенсами высоковирулентных штаммов вируса болезни Гамборо (номера в базе данных GenBank AY907013, KC189836, AY906997, AY907005, AY907007, AY907012, MF142563, MF142554, MF142562). Идентичность нуклеотидной последовательности гипервариабельного участка исследованных изолятов с соответствующими последовательностями высоковирулентных штаммов также составлял только 89,9-91,2%.

Согласно литературным данным характерными маркерами последовательности гена VP2 высоковирулентных штаммов считают присутствие определенных аминокислотных остатков: A222, I242, I256, I294, S299, L324, V321 (doi:10.4149/av_2017_02_09). В полученных в данном исследовании последовательностях, а также в сиквенсе изолята RU/AC-26757/01/2019 присутствовали ряд из них: I242, I256, I294, S299. В других позициях аминокислотные остатки отличались: V222, P324, A321. Аналогичные аминокислотные остатки присутствовали в изоляте RU/AC-26757/01/2019. Филогенетическое дерево полученных

сиквенсов с известными штаммами вируса ИББ доступно по запросу.

Заключение. В рамках данного исследования были получены сиквенсы двух образцов, принадлежащих изоляту вируса болезни Гамборо, выделенному в России в 2023 году. Данные последовательности отличаются от большинства сиквенсов гипервариабельного участка гена VP2, представленных в базе данных GenBank, и наиболее близки сиквенсу, полученному из изолята, обнаруженного в России ранее. Это может свидетельствовать о циркуляции на территории страны штамма «дикого» типа вируса, который отличается от штаммов, циркулирующих на территориях других государств. Полученные последовательности были опубликованы в базе данных GenBank (accession numbers OQ427405, OQ427406) и могут в дальнейшем использоваться для сравнения получаемых на территории России сиквенсов вируса ИББ.

Согласно ранее опубликованным данным, для описания высоковирулентных штаммов вируса болезни Гамборо является важным также сиквенс гена VP1 (doi.org/10.1099/vir.0.81184-0). В связи с ограниченной информацией, которую можно извлечь из анализа короткого (600 п.н.) сиквенса для более детальной характеристики штамма данного изолята следующим шагом является получение полной последовательности гена VP2 и последовательности гена VP1 для их совместного анализа.

ОСОБЕННОСТИ СПЕКТРА АЛЛЕЛЕЙ С ВЫСОКОЙ ЧАСТОТОЙ ГЕНА *DRB3* У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Лазебная И.В.¹, Лазебный О.Е.²

¹ ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН), Москва, Россия

² ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук (ИБР РАН), Москва, Россия

Введение. Представители вида *Bos taurus*, к которому относится тауриновый и зебувидный крупный рогатый скот (КРС), широко распространены практически на всех континентах, на территориях, значительно отличающихся друг от друга, как условиями внешней среды, так и условиями содержания. Учитывая это, а также многообразие пород, поддерживается значительный интерес к одному из наиболее полиморфных генов класса II главного комплекса гистосовместимости крупного рогатого скота, гену *DRB3* (NCBI, Gene ID: 282530, 23q21) (Opzadek et al., 2018). Второй экзон данного гена (54 аллеля) кодирует пептидсвязывающий центр β-цепи гетеродимерного белкового комплекса, обеспечивая связывание с широким спектром патогенов вирусной и бактериальной природы: возбудителями ящура, мастита, дерматофилы, а также лейкоза, вызываемого вирусом лейкоза крупного рогатого скота (bovine leukemia virus — BLV). Данный вирус представляет собой онкогенный дельтаретровирус, широко распространенный на Ближнем Востоке, в Европе, Азии и на Американском континенте. Ежегодные прямые убытки молочной промышленности, связанные с лейкозом у крупного рогатого скота, например, в США, составляют более 500 миллионов долларов (Rhodes

et al., 2003). Несмотря на принимаемые меры, заболеваемость лейкозом КРС в мире растет.

Цель и задачи. Учитывая значимость данного локуса, целью настоящей работы являлся сравнительный анализ внутривидовой аллельной изменчивости гена *DRB3.2* у отдельных пород крупного рогатого скота с учетом аллелей с высокой частотой. Задачей являлся анализ спектров аллелей с частотой выше 10% у разных пород крупного рогатого скота, представленных несколькими выборками.

Материалы и методы. Использованы собственные данные и опубликованные материалы о полиморфизме гена *DRB3.2* у тауриновых (голштинский, черно-пестрой российской, ярославской, костромской, шортгорнской) и зебувидных (гир) пород крупного рогатого скота, представленных несколькими стадами (2 — 10) (Lazebnaia et al., 2020). Проведено сравнение спектров частот аллелей данного гена на внутривидовом и межвидовом уровнях с выделением группы аллелей с частотой более 10%. Оценка достоверности различий распределений частот указанного спектра аллелей проводили с помощью G-теста.

Результаты. Установлено, что у большинства исследованных пород, кроме породы гир, в группу аллелей с высо-

кой частотой входят, главным образом, аллели, определяющие устойчивость (*11, *23 и *28) и/или восприимчивость (*8, *16, *22, *24) к лейкозу, вызванному BLV, значительно реже присутствуют нейтральные аллели. Проведенное сравнение распределений частот аллелей данного гена с частотой более 10% в группах выборок каждой из пород на основе G-теста, показало, что у всех пород, кроме ярославской, установлены достоверные различия ($P < 0,001$). У лучшей породы молочного направления, голштинской, в группе аллелей с высокой частотой входят в основном аллели восприимчивости, у костромской молочно-мясной породы преобладают аллели устойчивости. Отметим, что частота данных аллелей, равная 10% и выше, не может рассматриваться как случайная. В формировании этой группы аллелей в отдельных породах нельзя исключить эффект основателя, но вряд ли он является главным фактором. Вероятнее всего, многолетний отбор на высокие показатели молочной продуктивности привел к высокому содержанию аллелей восприимчивости у исследованного нами молочного скота. Обращает на себя внимание тот факт, что у японских шортгорнов (мясная порода), как и у породы гир, среди аллелей с высокой частотой отсутствуют аллели резистентности, во всех выборках присутствуют аллели восприимчивости и нейтральные. Такие различия могли сформироваться под влиянием разных направлений отбора у этих пород.

Вывод. Установлено, что у большинства исследованных пород в группе аллелей гена *DRB3* с высокой частотой

(10% и более) кроме нейтральных аллелей входят аллели резистентности и восприимчивости к лейкозу, вызванному вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Установлены внутривидовые различия по указанным спектрам аллелей гена *DRB3.2* (G-тест) у всех пород, кроме ярославской. Полученная картина породной специфичности распределения аллелей с высокой частотой может определяться различными механизмами, определить которые позволит системный мониторинг.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке государственных программ фундаментальных исследований №122022600162-0 и №0088-2021-0019.

Список литературы.

Lazebnaya I.V., Perchun A.V., Lazebny O.E. Intra- and interbreed variation of the BOLA-DRB3.2 gene in the Kostroma and Yaroslavl indigenous Russian cattle breeds // Immunogenetics. 2020. V. 72. P. 355–366. <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01173-7>

Oprzadek J.M., Brzozowska A.M., Urtnowski P., Rutkowska K., Lukaszewicz M. Association of BOLA-DRB3 genotype with somatic cell count in milk of Polish Holstein cattle. R. Bras Zootec 2018. 47. <https://doi.org/10.1590/rbz4720150290>

Rhodes J. K., Pelzer K. D., Johnson Y. J. Economic Implications of Bovine Leukemia Virus Infection in Mid-Atlantic Dairy Herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2003. 223 (3): 346–352. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.223.346>

ПДРФ-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ ПСЕВДОМОНАД, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Терлецкий В.П.^{1,2}, Овчарова Е.С.¹

¹ *Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства* — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук (Санкт-Петербург-Ломоносов, Россия)

² ГАОУ ВО ЛО «Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина» (Санкт-Петербург-Пушкин, Россия)

Введение. К числу наиболее распространенных в объектах внешней среды бактерий относятся представители рода *Pseudomonas*. Именно эти микроорганизмы часто используются при создании биопрепаратов, причем их эффективность зависит от наличия специфических плазмид [1; 3]. Коммерческое производство биопрепаратов, основанных на использовании бактериальных штаммов сопряжено с опасностью контаминации оригинального штамма другими микроорганизмами, не имеющими полезных свойств. Единственным способом подтверждения идентичности штамма в выпускаемом биопрепарате запатентованному оригиналу из зарегистрированной коллекции является генетическая паспортизация, основанная на получении своеобразного «штрих-кода», характерного для данного штамма.

Существуют множество способов идентификации штаммов, основанных на секвенировании участков генома, отдельных генов, проведения полимеразной цепной реакции и анализа анонимных последовательностей ДНК (методы ПЦР со случайными праймерами и пульс-гель

электрофорез — ПГЭ). Последний метод считается «золотым стандартом» генотипирования в отношении целого ряда микроорганизмов, так как обладает очень высокой разрешающей способностью [4], однако, метод также не лишен недостатков. В этой связи были проведены поисковые исследования на разработку альтернативного способа генотипирования микр организмов. В результате был предложен метод двойного расщепления и избирательного мечения (ДРИМ), который по своим возможностям не уступает ПГЭ, но значительно быстрее и не требует специализированного оборудования [2]. Метод был адаптирован для генотипирования бактерий рода *Pseudomonas*, обладающих способностью расщеплять и усваивать сложные углеводороды (нефть, мазут)

Цель работы состояла в использовании метода ДРИМ для идентификации штаммов бактерий-деструкторов нефтепродуктов из рода *Pseudomonas*. Решаемые задачи включали в себя выращивание микроорганизма и подтверждение их видовой принадлежности стандартны-

ми биохимическими и культуральными методами, проведение генотипирования методом ДРИМ и анализ полученных генетических профилей бактерий.

Материалы и методы. Идентификация штаммов деструкторов рода *Pseudomonas* основывалась на ранее высказанной идее двойного расщепления и избирательного мечения (ДРИМ) фрагментов геномной ДНК бактерий [2; 4]. Принципиальное отличие метода ДРИМ от других методов генотипирования заключается в идее совмещения в одной реакции расщепления бактериальной ДНК двумя ферментами рестрикции и одновременном мечении небольшой группы получаемых фрагментов. Используется две эндонуклеазы рестрикции — первая и вторая. Первая эндонуклеаза рестрикции *VcuI*, имеет сайт расщепления в ДНК T↓CTAGA. Данный фермент имеет небольшое число сайтов расщепления в геномах *Pseudomonas* (от 20 до 80 в зависимости от вида) и производят «липкие» концы, которые метятся в реакции достройки биотинилированным дезоксицитозинном с помощью фермента *Taq*-полимеразы. Получаемые фрагменты ДНК не могут быть разделены в обычном агарозном геле, так как являются слишком крупными. Поэтому, в реакцию вводим вторую эндонуклеазу рестрикции, производящей либо тупые, либо 3'-выступающие концы фрагментов ДНК, которые не могут включить Bio-dCTP. В данном случае, поиск *in-silico* и предварительные эксперименты показали, что оптимальным выбором будет *Eco147I*, которая имеет 800-2000 сайтов расщепления у различных видов псевдомонад. Окончательный подбор ферментов основывался не только на частотах расщепления геномной ДНК псевдомонад, но и на совместимости ферментов в одном реакционном буфере. В результате такого двойного расщепления размер фрагментов ДНК является оптимальным для разделения в агарозном геле. Таким образом, в реакционной смеси присутствует ограниченное число меченых фрагментов ДНК, которые могут быть разделены и впоследствии визуализированы.

Основные результаты. Выявляемый в результате генотипирования «штрих-код» проявляется в виде 30 и более хорошо детектируемых полос на фильтре, число и распределение которых характерно для каждого штамма.

Анализ количества и распределения фрагментов ДНК на фильтре позволил выявить 7 разных генотипов в группе

изучаемых псевдомонад, включающих от 1 до 3 изолятов бактерий:

I генотип: 1-1; 10-1; Pp-2

II генотип: 14-2; лб 3-2

III генотип: ку-1

IV генотип: ко-1

V генотип: pp-5

VI генотип: pp-7

VII генотип: P.pol. G+

Были также выявлены 2 кластера генетически близких генотипов, отличающихся на единичные фрагменты:

II кластер: 14-2/лб 3-2; pp-7

III кластер: ко-1; pp-5

Значительное генетическое удаление от остальных изолятов показали образцы ку-1 и P.pol. G+, отличающихся как по числу фрагментов ДНК, так и по их распределению

Заключение. Таким образом, использованный для генотипирования псевдомонад метод, позволил разделить группу изолятов на кластеры в соответствии с количеством выявляемых общих фрагментов. Метод может эффективно использоваться для паспортизации штаммов бактерий рода *Pseudomonas*

Литература:

1. Панов А.В., Волкова О.В., Пунтус И.Ф., Есикова Т.З., Кошелева И.А., Боронин А.М. *scrA* — новый ген салицилатгидроксилазы, локализованный на плаزمиде деградации салицилата/капролактама // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. № 1. С. 116-123. DOI: org/10.7868/S002689841301014X

2. Щепеткина С.В., Новикова О.Б., Забровская А.В., Терлецкий В.П., Тыщенко В.И. Современные принципы антибиотикотерапии в птицеводстве. Изд-во ФГБОУ ВПО «СПб-ГАВМ». Санкт-Петербург. 2015. 160 с.

3. Petrikov K.V., Deegan Ya.D., Surin A., Ponamorenva O.N., Puntus I.F., Filonov A.E., Boronin A.M. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: formation and structure // Process Biochemistry. 2013. Vol. 48(5-6). P. 931-935. DOI: 10.1016/j.procbio.2013.04.008

4. Terletski V. P., Schwarz S., Carnwath J., Niemann H. Subtracted restriction fingerprinting — a tool for bacterial genome typing // BioTechniques. 2003. Vol. 34(2). P. 304-313. DOI: 10.2144/03342rr01.

ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОМА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Мазлум Али*

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

Введение. Африканская чума свиней — это контактная вирусная болезнь свиней, распространяющаяся с 2007 году в странах Европы и Азии, вызванная вирусом АЧС II генотипа. Вследствие длинного генома возбуди-

теля (170-193 т.п.н.), молекулярно-генетический анализ новых выделенных изолятов вируса АЧС проводят с использованием различных маркеров. Большинство таких фрагментов выявляют, исходя из однонуклеотидных по-

лиморфизмов или различий в числе нуклеотидных или аминокислотных тандемных повторов, наблюдаемых во время сравнительного анализа полногеномных последовательностей изолятов, выделенных из эпизоотических очагов АЧС. Хотя полногеномное секвенирование остается «золотым стандартом» для изучения эволюционных изменений, секвенирование одного переменного локуса с различными точечными мутациями (инсерциями, делециями или заменами) может использоваться в качестве быстрой и экономически эффективной альтернативы для характеристики группы изолятов из одной или географически связанных вспышек.

Пространственно-временной анализ вируса АЧС на территории Российской Федерации, основанный на сочетании данных полногеномного секвенирования и геномных маркеров, никогда не проводился.

Цель и задачи — проведение полногеномного секвенирования, молекулярно-генетического и филогенетического анализов, по результатам которых можно обозначить перспективные для молекулярно-эпизоотологической группировки и пространственно-временного анализа маркерные области, характерные для каждого географического кластера на территории Российской Федерации.

Материалы и методы. В работе использованы 40 изолятов вируса АЧС, выделенные от домашних свиней и диких кабанов в различных регионах Российской Федерации в период с 2018 по 2022 год. Вирус АЧС накаплива-

ли в первичной культуре клеток селезенки свиней (СС) до конечного титра не менее $6,0 \text{ Ig ГАЕ}50/\text{см}^3$. Полученный вирусосодержащий материал использовали для выделения геномной ДНК (гДНК). Экстракцию гДНК проводили с использованием фенола и хлороформа. Секвенирование проводили с использованием наборов Nextera XT DNA library preparation kit и Next Generation Sequencing (NGS), MiSeq reagent kit version 2 с 2×250 -п.н. и секвенатора Illumina (США). Собранную последовательность генома выравнивали согласно нуклеотидной последовательности генома референс-штамма FR682468.2_ASFV / Georgia 2007/1. Для проведения сравнительных молекулярно- и филогенетического анализов данные о ранее секвенированных изолятах вируса АЧС из РФ и других стран получены из базы данных GenBank и референтной лаборатории по АЧС (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Вышеперечисленные последовательности использовали для обнаружения точечных мутаций (делеций/замен/инсерций), выравнивания и определения филогенетического родства изолятов вируса АЧС между собой. Выравнивание и обнаружение точечных мутаций выполняли с использованием программного обеспечения CLC Genomics Workbench v.9 (QIAGEN, Германия). Сравнительный филогенетический анализ последовательностей выполняли методом “Bootstrap” (максимального подобия) с 1000 итерациями начальной загрузки по модели общего обратимого времени (GTR, $G + I = 4$) в компьютерной программе Mega X.

РЕЗУЛЬТАТЫ. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛАСТЕРИЗАЦИИ ПРЕДСТАВЛЕНЫ В ТАБЛИЦЕ.

Кластер	Субгруппа внутри одной маркерной области генома							
	B646L	CVR (B602L)	K145R	MGF 505 5R	MGF 110 7L	IGR I73R/ I329L	DP60R	MGF 360-10L
Калининград («Запад»), РФ	II	1	3	2	2	1, 2	1	1
Европа	II	1-4, 7-10	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2, 4	1	1
Кавказ	II	1, 2	1	1	1	1	1	1
Центральная РФ («Центр»)	II	1, 5, 6	1	1	1	1, 2	1	1
Дальний Восток РФ («Восток»)	II	1, 11	1	1	1	1, 2	2	1, 2
Китай	II	1, 2	1	1	1	2, 3	1	2

Для 8 изолятов из Калининградской области, объединенных в кластер «Запад», была характерна 3 группа по маркеру K145R, уникальная для данного региона. Точечные мутации в генах MGF 505 5R и MGF 110 7L у изолята из этого субъекта также соответствуют 2-ому кластеру, характерному для стран Европы (Польша, Германии, Украины).

Для 20-ти изолятов, выделенных в Дальневосточном федеральном округе России, выявлены уникальные геномный маркер DP60R и субгруппа 11 по центральному переменному региону (CVR) гена B602L. 17 из 20-ти изолятов относились ко 2-ому кластеру по MGF 360-10L, что делает их родственными с циркулирующим вирусом АЧС в Китае.

Наиболее перспективным маркером для кластера «Центр» (Россия) является CVR, поскольку на сегодняшний день в регионах Центральной России зарегистрированы 3 субгруппы (1,5,6).

Однако межгенную область I73R/I329L нельзя назвать подходящим генетическим маркером для дифференциации изолятов вируса АЧС из России, поскольку во всех трех основных кластерах (Запад, Центр, Восток) выявлены обе (1 и 2) субгруппы.

Заключение. Анализ полногеномных последовательностей показывает, что изоляты в основном группируются в зависимости от их географического происхождения и распределяются между азиатско-восточным,

центральной, европейско-западными кластерами. Анализ маркерных участков отражает это пространственно-временное распределение при использовании одного набо-

ра областей генома, тогда как для других маркеров результаты могут быть более конкретными внутри одного субъекта страны.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОПЛАЗМЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Козлова А.Д., Горбачева Н.С., Красникова М.С., Брюсова М.Б., Яцентюк С.П.

ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», Москва, Россия

Микоплазмы широко распространены в природе и представляют собой большую группу патогенных и сапрофитных микроорганизмов класса *Mollicutes*. Многие микоплазмы являются возбудителями заболеваний широкого круга млекопитающих, птиц и человека, а некоторые виды встречаются у рыб, моллюсков, насекомых и растений.

Микоплазмы нередко являются контаминантами иммунобиологических препаратов. Источниками такой контаминации может быть материал биологического происхождения, используемый при производстве вакцин, а также персонал, занимающийся изготовлением таких препаратов (1). В литературе представлены сообщения о выделении из клеточных линий не менее 20 видов микоплазм, из них 95% случаев приходится на 7 видов: *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. salivarium*, *Acholeplasma laidlawii*. (2).

При этом, несмотря на высокую специфичность в отношении природных хозяев, микоплазмы являются неспецифичными в отношении вида клеток, инфицируемых *in vitro*. Первичные клеточные линии оказываются зараженными микоплазмами приблизительно в 1% случаев, культуры, прошедшие первые 3-5 пассажей — до 5% случаев, средняя зараженность длительноперевиваемых линий составляет от 15 до 35%. (2).

Согласно требованиям Государственной Фармакопеи Российской Федерации (ОФС.1.7.2.0031.15 Испытания на присутствие микоплазм), необходимо лабораторными методами подтверждать отсутствие микоплазменной контаминации в готовом продукте, в посевных (исходных) клетках, мастер банке, рабочем банке, производственных и контрольных клеточных культурах, посевном и рабочем вирусных банках, а также в добавках к питательным средам животного происхождения (трипсин, сыворотка крови животных и др.) (3).

В настоящее время в России действует ГОСТ Р 56140-2014 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Выявление ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* методом ПЦР», согласно которому микоплазмы в вакцинах для животных выявляют методом классической ПЦР. Этот метод хорошо зарекомендовал себя, но требует соответствующего оснащения лаборатории для проведения электрофоретической детекции продуктов ПЦР в агарозном геле. Поэтому целью нашей

работы являлась разработка методики выявления представителей семейства *Mycoplasmataceae* в иммунобиологических препаратах для ветеринарного применения методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени».

Материалы и методы. Использованы 14 штаммов и изолятов микоплазм и 43 образца изолятов и штаммов гетерологичных микроорганизмов, вызывающих заболевания животных и птиц. Исследовали отечественные и зарубежные вакцины: 71 вакцину для профилактики заболевания птиц, 13 вакцин для профилактики заболеваний свиней, 7 вакцин для профилактики заболеваний КРС и МРС и 5 вакцин для профилактики болезней кроликов.

Выделение ДНК проводили коммерческими наборами «Рибо-преп» и «ДНК-сорб-В» (Амплисенс, Россия) согласно инструкциям производителя.

Аmplификацию и детекцию продуктов амплификации проводили на приборах RotorGene Q (Qiagen, Германия), CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с реагентами производства «BelBioLab».

Исследования вакцин для подтверждения наличия/отсутствия контаминации проводили согласно ГОСТ Р 56140-2014 с последующим дополнительным подтверждением положительных результатов с помощью секвенирования и с помощью разработанной методики.

Характеристики разработанной методики сравнивали с аналогичными характеристиками коммерческих наборов «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ФАКТОР» (ООО «ВЕТ ФАКТОР») и «MYCO REAL-TIME Набор для выявления контаминации микоплазмой культур клеток методом ПЦР-РВ» (ЗАО Евроген).

Результаты. В результате анализа множественного выравнивания, полученного с помощью программного обеспечения Vector NTI Advance 11.5.0 на основании нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank, была выбрана система праймеров и зонд, амплифицирующие участок гена 16S рРНК. При тестировании выбранных олигонуклеотидов на контрольной панели образцов, содержащей РНК/ДНК различных видов микроорганизмов, вирусов и геномную ДНК различных животных было показано, что праймеры, амплифицируют только ДНК представителей семейства *Mycoplasmataceae* (включая *Acholeplasma laidlawii* и *Spiroplasma citri*) и не дают положительного результата

амплификации с генетическим материалом гетерологичных штаммов и геномной ДНК разных видов животных.

Для контроля качества выделения нуклеиновых кислот и отсутствия ингибиторов ПЦР в методику была введена система амплификации геномной ДНК животных (внутренний эндогенный контроль), которую детектировали одновременно со специфической мишенью.

При сравнении разработанной методики с коммерческими наборами «ПЦР– МИКОПЛАЗМОЗ-ФАКТОР» и «MYCO REAL-TIME» была показана схожая чувствительность при исследовании 10-кратных разведений штамма *M. arginini*.

При оценке специфичности на панели гетерологичных штаммов с помощью разработанной методики и с помощью коммерческих наборов были получены положительные результаты для *Acholeplasma laidlawii*. При этом, в отличие от разработанной методики и набора «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ФАКТОР», набор «MYCO REAL-TIME» показал неспецифические реакции с ДНК *Streptococcus suis* Касли, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 и *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

При анализе живых вирусных вакцин для птиц, протестированных по методике ГОСТ 56140, разработанная методика и набор реагентов «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ФАКТОР» показали сходные результаты: разработанная методика и набор реагентов «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ФАКТОР» выявили все образцы, в которых

методом секвенирования было подтверждено загрязнение микоплазмами (4).

Разработанная методика показала достаточные чувствительность и специфичность при исследовании вакцинных препаратов для животных и может быть рекомендована для исследования иммунобиологических лекарственных средств на загрязненность микроорганизмами семейства *Mycoplasmataceae* и *Acholeplasma laidlawii*.

1. Суханова С.М. Бердникова З.Е., Тихонова А.С. Совершенствование методики оценки качества питательной среды для выявления микоплазм // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2019. Т.19 №3 с. 161-168.

2. Шалунова Н.В., Волкова А.Р. и др. Микоплазмы — контаминанты клеточных культур. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2016. Т.16 №3.

3. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание, 2022. ОФС.1.7.2.0031.15 Испытания на присутствие микоплазм.

4. Горбачева Н.С., Брюсова М.Б., Красникова М.С., Яцентюк С.П. Исследования иммунобиологических препаратов для ветеринарного применения на наличие микоплазм методом ПЦР // Мат. межд. науч.-прак. конф: Экономически и социально значимые инфекции сельскохозяйственных животных: меры профилактики и борьбы. 2022. — С. 189-196.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ СТАДА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, СВОБОДНОГО ОТ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КОРОВ

Д.А. Бабошко^{1,3}, К.А. Елфимов^{1,3}, А.И. Кузьмин², О.А. Рожков², А.В. Тотменин¹, М.В. Флеер², Н.М. Гашникова¹

¹ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

² ГБУ НСО «Управление ветеринарии Коченевского района», Коченёво, Россия

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Введение. Лейкоз крупного рогатого скота — это хроническое инфекционное заболевание вирусной природы. Данное заболевание вызвано РНК-содержащим вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС). Вирус относится к семейству Retroviridae, роду Deltaretrovirus. Обязательным этапом жизненного цикла ВЛКРС является встраивание ДНК-генома вируса в геном клетки-хозяина. ВЛКРС имеет широкое распространение как в субъектах Российской Федерации, так и во многих странах мира, занимая первое место по распространенности среди заболеваний крупного рогатого скота. Ущерб, наносимый вирусным лейкозом крупному рогатому скоту, достигает серьёзных масштабов из-за снижения продолжительности жизни, снижения надоев, затрат на пастеризацию и выбраковки племенных животных как из селекционных работ, так и продаж и.

Методы, которые чаще всего используются для диагностики ВЛКРС — иммуноферментный анализ на выяв-

ление антител к ВЛКРС (ИФА) и реакция иммунодиффузии (РИД), в некоторых случаях бывают неэффективны. Нельзя применять ИФА на ВЛКРС у новорожденных телят, так как у них присутствуют колостральные антитела. Затруднено выявление инфицированных животных с низким уровнем антител или не имеющих антител против ВЛКРС. Исследования животных, предназначенных на экспорт и импорт.

Данные проблемы решает метод ПЦР-диагностики, так как может с высокой точностью определить вставку provirus ВЛКРС в геном хозяина.

Целью работы является тестирование молодняка крупного рогатого скота на наличие инфекции ВЛКРС в рамках мероприятий по созданию здорового стада в животноводческом хозяйстве Коченевского района Новосибирской области.

Материалы и методы. По мере достижения телятами возраста от 1,5 до 3 месяцев проводился сбор крови

из хвостовой вены для скрининга на ВЛКРС. С марта по август 2023 года собрано и исследовано 434 образца крови телят в возрасте до 3 месяцев. Для скрининга телят на ВЛКРС в работе использовался ПЦР в реальном времени с помощью набора РеалБест-Вет ДНК вируса лейкоза КРС V-5441 производства ВекторБест. Дополнительно для положительных образцов проводили ПЦР с лабораторным набором праймеров на фрагмент гена *env* ВЛКРС протяженностью 1000 п.н и последующим секвенированием полученного вирусного фрагмента.

Результаты. Настоящее исследование является продолжением работы с хозяйствами НСО по улучшению ситуации с пораженностью скота ВЛКРС. На первом этапе была проведена оценка пораженности, показавшая высокий процент распространения инфекции от 10% до 78%. Схема включала в себя сбор образцов крови от молодняка до 3 месяцев и тестирование ПЦР набором в режиме реального времени. После первичного скрининга телят использовали раздельное содержание здорового скота с соблюдением всех ветеринарно-эпидемиологических норм. Через 3 месяца для здоровых животных повторно проводился ПЦР анализ, после чего здоровые животные содержались отдельно от основного стада.

В ходе сотрудничества было собрано 434 пробы крови телят 44 из них оказались положительными по *real-time*-ПЦР анализу на ВЛКРС. Последующая ПЦР — диагностика с лабораторным набором праймеров проводилась для всех образцов, положительных на первом этапе скрининга, дополнительно было протестировано 40 образцов крови телят, которые были строго негативны по *real-time* скринингу. В качестве положительного контроля использовались образцы, ранее определённые как положитель-

ные, с подтверждением секвенирования. ПЦР-анализ показал 100 % совпадение данных ПЦР-диагностики по *env* ВЛКРС с ранее полученными результатами скрининга, что говорит о высокой специфичности, точности и возможности применения для скрининга данной *real-time* тест системы. После секвенирования был проведён филогенетический анализ. Филогенетический анализ позволил отнести 33 исследованных ВЛКРС к генотипу 4, 11 вариантов вируса — к генотипу 7. Кластеризация полученных последовательностей наблюдается только между образцами, собранными в данном хозяйстве, что говорит о долгом развитии инфекции внутри данного хозяйства.

Выводы. Внедрение ПЦР-технологий для диагностики ВЛКРС позволяет с высокой эффективностью проводить отбраковку инфицированных ВЛКРС животных. В том числе, скрининг телят на ВЛКРС методом ПЦР в реальном времени показал высокую специфичность и чувствительность этого метода, что позволяет применять данный тест на выявление вирусносительства среди молодняка и взрослых животных в рамках реализации комплекса мероприятий по элиминации ВЛКРС.

Данное исследование пораженности молодняка КРС является первым шагом сотрудничества частного хозяйства с научным учреждением, направленным на формирование здорового стада КРС. Дополнительно проводимый анализ пораженности коров и филогенетический анализ расшифрованных образцов ВЛКРС позволяет понять пути заноса и распространения ВЛКРС, что необходимо при разработке эффективных программ по оздоровлению крупного скота в регионах России.

Работа выполнена в рамках Государственного задания 4/21 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Морозова Е.О., Садчикова А.С., Шотин А.Р., Иголкин А.С., Мазлум Али

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

Введение. Африканская чума свиней (АЧС) — контагиозная вирусная болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, цианозом кожи и обширными гемorragиями во внутренних органах. Отсутствие эффективных и безопасных средств специфической профилактики и летальность у зараженных животных достигающая 100 % оказывают влияние на развитие отрасли свиноводства и международную торговлю. Этиологическим агентом АЧС является ДНК-содержащий вирус семейства *Asfarviridae* рода *Asfivirus*.

Оперативная диагностика остается актуальным направлением в контроле за распространением инфекции, поскольку позволяет определить наличие инфекционного агента на начальных этапах болезни и выработать оптимальную стратегию её искоренения. Использование

метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) является наиболее распространённым для диагностики АЧС, преимущество которого заключается в скорости проведения и учета реакции, так же обусловлено высокой чувствительностью, специфичностью и достаточной экономичностью для исследователя.

Цель и задачи. разработка мультиплексного ПЦР-РВ с использованием зондов Taqman с внутренним контрольным образцом, который позволит избежать ложноотрицательных результатов посредством контроля качества этапа выделения нуклеиновой кислоты.

Новизна. Разработана мультиплексная ПЦР-РВ, которая позволяет выявлять все известные генотипы вируса АЧС, обладающая 100%-ми показателями диагностической чувствительности и специфичности.

Материалы и методы. Для определения аналитической специфичности разрабатываемого метода исследовались положительные (штамм АЧС «Arm 07») и отрицательные образцы, включая суспензии культуры клеток, содержащие вирусы репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC), болезни Ауески, классической чумы свиней (КЧС) и бактерии *Pasteurella multocida*,

В ходе дизайна праймеров проведен молекулярно-генетический и филогенетический анализы с определением консервативных участков генома. Зонды к целевому фрагменту АЧС подобраны на зеленый флуоресцирующий канал (FAM), а зонды к внутреннему контрольному образцу подобраны на красный флуоресцирующий канал (Cy5). Следующим шагом проведен выбор компонентов ПЦР-смеси и оптимизация условий реакции.

Вирусную ДНК выделяли из клеточной культуры с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» предназначенного для выделения ДНК из клинического материала (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) с добавлением внутреннего контрольного образца (плазмиды pJET-BKO).

Результаты. Анализ ПЦР в реальном времени оптимизирован с использованием общего объема 25 мкл на одно исследование. По составленному протоколу смесь для постановки реакции рассчитывалась (из расчета на 1 пробу): 2,5 мкл ПЦР буфер (10X); по 1 мкл (4 пмоль каждого) праймеры, специфичные к участку генома вируса АЧС (прямой и обратный); 0,5 мкл (1 пмоль) зонд, специфичный к участку генома вируса АЧС (FAM), по 1 мкл (5 пмоль каждого) праймеры на целевой ВКО (прямой и обратный), 1 мкл (2,5 пмоль) зонд на целевой ВКО (Cy5)

и 1 мкл деионизованной воды свободной от нуклеаз. Оптимальный температурный профиль: циклирование (45 циклов), начиная с 20 сек 95°C (денатурация), 20 сек 60°C (отжиг праймеров), 20 сек 72°C (элонгация)

Проведена проверка валидируемых параметров таких как воспроизводимость, специфичность и аналитическая чувствительность, в ходе которой определен предел детекции, который соответствовал разведению в 10^{-5} (соответствующий титр вируса 1,2 ГАдЕ50). Для определения предела детекции использовали штамм АЧС «Arm 07», исходный титр которого составлял 4,76 ГАдЕ50. Воспроизводимость оценивали по результатам регрессионно-корреляционного анализа, показавшего коэффициент адекватности (R²) более 99 %, что говорит о высокой воспроизводимости предложенной методологии. Для определения специфичности использовали положительные образцы вируса АЧС штамма Arm 07 и также отрицательные образцы включая суспензии культур клеток, содержащие вирусы PPCC, болезни Ауески, КЧС и бактерий *Pasteurella multocida*. Параметры специфичности составили 100 %.

Заключение. В результате проведенного комплекса исследований, отработаны параметры проведения реакции и интерпретации полученных данных по выявлению ДНК вируса АЧС методом ПЦР в режиме реального времени, которая обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Данная методика воспроизводима и может быть использована при проведении диагностических исследований в ветеринарных лабораториях и научных центрах РФ. Основные валидационные параметры разработанной методики на основе ПЦР-РВ соответствуют требованиям ГОСТ ИСО 17025-2019.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОМОТОРОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Рудакова С.В., Кольцов А.Ю., Сухер М.М., Кольцова Г.С., Холод Н.С.

ФГБНУ ФИЦВиМ, пгт.Вольгинский, Россия.

Введение. Африканская чума свиней (АЧС) — особо опасная высококонтагиозная болезнь домашних и диких свиней, характеризующаяся лихорадкой, обширными геморрагиями и цианозом кожи, тяжёлыми и некротическими поражениями внутренних органов и очень высокой летальностью. Заражение вирусом происходит аэрогенным, алиментарным путями и через повреждённые слизистые оболочки. Заболевание не зависит от времени года, породы и возраста свиней и распространено практически повсеместно, а многочисленные попытки получить эффективную и безопасную вакцину на данный момент не дали положительных результатов. При отсутствии вакцины заболевание неизбежно приводит к значительным экономическим потерям, а единственными методами борьбы является карантин поражённой территории и убой инфицированных животных.

Возбудителем АЧС является крупный цитоплазматический ДНК-содержащий вирус, являющийся единствен-

ным членом семейства *Asfaviridae*, рода *Asfivirus*. Активация транскрипции вирусных генов на начальном этапе происходит за счёт взаимодействия элементов клеточного транскрипционного аппарата с ранними вирусными промоторами, находящимися перед открытой рамкой считывания этих генов. Далее, экспрессия генов вируса АЧС происходит в упорядоченной последовательности по типу каскадного механизма. Перед репликацией ДНК запускаются пред-ранние гены, затем ранние гены. После начала репликации ДНК начинается уже транскрипция средних генов, а транскрипция поздних генов достигает максимальных уровней через 12-16 часов после инфекции. Транскрипция средних и поздних генов активируется вирусными белками. Такой механизм регуляции транскрипции обеспечивает вирусу относительную независимость от хозяина и точный позиционный и временной контроли экспрессии его генов. На основе биоинформа-

тического анализа генома вируса АЧС и его транскрипты были получены данные, позволяющие предположить, какие гены являются ранними, а какие поздними. Однако экспериментального подтверждения получено немного.

Одним из современных подходов к разработке вакцин против АЧС состоит в получении рекомбинантных вирусов, с удалёнными и/или изменёнными генами. Для селекции таких рекомбинантных вирусов часто используют репортерные гены под контролем вирусных промоторов. На данный момент самым изученным промотором вируса АЧС является поздний промотор гена B646L, кодирующего основной белок капсида р72. Поиск и характеристика других промоторов вируса африканской чумы свиней позволит получать рекомбинантные вирусы с разным уровнем и временем экспрессии интересующих генов.

Цель работы: Охарактеризовать промоторы вируса АЧС.

Задачи:

- Получить генетические конструкции, содержащие репортерный ген GFP под контролем одного из 4 промоторов генов CP2475L, D1133L, A137R и E184L вируса АЧС;
- Изучить время включения промоторов по появлению сигнала GFP;
- Изучить силу промоторов по накоплению репортерного гена.

Материалы и методы. В работе использовались штамм МК200 вируса АЧС из ГК ФГБНУ ФИЦВиМ, культура клеток почки зелёной мартышки COS-1, наборы для выделения ДНК, реактивы для проведения ПЦР и молекулярного клонирования, компетентные клетки E.coli XL1-blue, также реактивы для культивирования клеток и трансфекции. В исследовании проводили биоинформатический анализ генома вируса АЧС, ПЦР и молекулярное клонирование, культивирование и трансфекцию клеток COS-1 плазмидными ДНК, инфекцию вирусом АЧС. Детекцию GFP осуществляли флуоресцентной микроскопией и спектрофотометрией.

Основные результаты. В ходе анализа генома вируса АЧС были выбраны четыре потенциально поздних промотора генов CP2475L, D1133L, A137R и E184L вируса АЧС для их характеристики. Последовательности этих промоторов были клонированы перед геном репортерного белка GFP в векторе pUC57. Клетки COS-1 трансфецировали полученными конструкциями, а затем инфицировали вирусом АЧС и провели флуоресцентную микроскопию на системе «CELENA X» в режиме реального времени в течение 20 часов. Анализ включения выбранных промоторов на основе разгорания сигнала GFP показал, что все промоторы действительно относятся к поздним промоторам вируса АЧС.

Сила промоторов оценивалась по удельной флуоресценции (RFU) GFP на мкг белка. Анализ силы промоторов показал, что 3 промотора оказались сильнее изученного промотора гена B646L (промотор гена A137R в 5,2 раза, гена CP2475L в 9,9 раз и гена E184L в 22 раза, соответственно). Тогда как промотор гена D1133L оказался в 2 раза слабее референтного промотора гена B646L. Стоит отметить, что самым сильным из проанализированных промоторов является промотор гена E184L, функция которого на сегодня не установлена. Использование данных сильных поздних промоторов позволит более эффективно проводить селекцию рекомбинантных вирусов, а также значительно усилить экспрессию интересующих вирусных генов.

Заключение/выводы

- 1) Получены генетические конструкции, содержащие репортерный ген GFP под контролем промоторов генов CP2475L, D1133L, A137R и E184L вируса АЧС;
- 2) Все охарактеризованные промоторы относятся к промоторам поздних генов вируса АЧС;
- 3) Промоторы генов CP2475L, A137R и E184L являются более сильными по сравнению с изученным промотором гена B646L, тогда как промотор гена D1133L слабее референтного промотора.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ВЕТЕРИНАРИИ

Тыщенко В.И., Овчарова Е.С.

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук (Санкт-Петербург-Ломоносов, Россия)

Введение. Обсуждая проблему инфекционных болезней, ветеринарные специалисты, прежде всего, рассматривают вопросы диагностики, лечения, профилактики, экономических потерь и социального влияния заболевания на общество. Часто профилактика является наиболее эффективным инструментом, способным решить вопросы контроля над распространением инфекции [1; 2].

Разрабатывая ветеринарно-профилактические мероприятия важно понимать пути передачи инфекции между особями и своевременно находить источник патогена в объектах внешней среды. Эти вопросы решаются путем применения методов генотипирования микроорганизма в системе профилактических мероприятий. Диагностика заболевания, включая ПЦР-анализ, дает возможность лишь указать на биологический вид возбудителя. Необходимы

способы более точного выявления генетических вариантов микроорганизма. Быстрый и точный метод идентификации бактериальных штаммов позволяет на научной основе планировать противоэпизоотические мероприятия [3]. Существует две основные стратегии выявления полиморфизма: секвенирование (определение последовательности нуклеотидов в ДНК) и фрагментный анализ. В последнем случае последовательность нуклеотидов не определяют, а анализируют распределение фрагментов ДНК в геле после электрофореза. Фрагменты ДНК в процессе электрофореза разделяются по размеру, давая своеобразный «штрих-код», характерный для каждого штамма. Если все фрагменты в сравниваемых двух патогенах, выделенных из двух особей, совпадают, в этом случае можно говорить о передаче возбудителя между особями. Если фрагменты не совпадают, то заражение двух особей произошло из разных источников.

В настоящее время циркулирование патогенных видов бактерий на птицефабриках России находится под жестким контролем ветеринарных служб. Очаги инфекции быстро локализуются и устраняется опасность распространения инфекции. В то же время, условно-патогенная микрофлора все чаще вызывает заболевания у животных. К наиболее часто встречающимся этиологическим факторам инфекционных заболеваний относят *Escherichia coli*, являющейся частью нормальной микрофлоры кишечника, но в определенных условиях появляются патогенные штаммы, наносящие урон птицеводству [4].

Цель работы заключалась в использовании метода двойного расщепления и избирательного мечения

(ДРИМ) на группах изолятов *E. coli*, выделенных от больных и павших кур промышленных птицефабрик страны. В рамках достижения поставленной цели решались задачи по выделению бактерий из разных органов птиц, видовой идентификации бактерий, выделению геномной ДНК и проведению генотипирования методом ДРИМ.

Материалы и методы. Геномная ДНК выделялась из 29 бактериальных изолятов *E. coli*. Метод основан на ранее выдвинутой нами идее двойного расщепления и избирательного мечения рестриционных фрагментов ДНК (ДРИМ). Геномная ДНК микроорганизма расщепляется одновременно двумя ферментами рестрикции и отдельные фрагменты, полученные при расщеплении первым ферментом, метятся биотинилированным дезоксицитозинтрифосфатом с помощью Taq-полимеразы. Вторым ферментом укорачивают эти длинные фрагменты для последующего агарозного гель-электрофореза [3; 5]. В случае генома *E. coli* оптимальной парой ферментов является XbaI/PstI, при использовании которой регистрируется 30-50 четко различимых фрагментов ДНК, распределение которых специфично для каждого бактериального штамма. Данный подход был реализован при генотипировании ряда других патогенных микроорганизмов [5]. К числу преимуществ предлагаемого метода относятся быстрота выполнения анализа, доступность реактивов и приборов.

Основные результаты. Предварительно тестировали несколько эндонуклеаз рестрикции с целью получения оптимального количества и распределения фрагментов ДНК (таблица).

ТАБЛИЦА. ФЕРМЕНТЫ РЕСТРИКЦИИ ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ РАЗМЕРА ФРАГМЕНТОВ ДНК В ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ДРИМ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКИ (ВСЕ РЕСТРИКЦИОННЫЕ БУФЕРА ПРОИЗВОДСТВА THERMO FISHER SCIENTIFIC™)

Фермент	Число сайтов в геноме <i>E.coli</i>	Оптимальный буфер	Эффективность в буфере O (%)	Эффективность лигирования (%)
<i>Eco32I</i>	2440	R	50-100	95
<i>Eco47III</i>	902	R	50-100	95
<i>DraI</i>	2017	Tango™	20-50	95
<i>PvuI</i>	1463	R	50-100	90
<i>PvuII</i>	2087	G	20-50	90
<i>Mph110I</i>	1073	R	20-50	95
<i>PstI</i>	1349	O	100	95

По результатам генотипирования было выявлено 14 различных генотипов *E.coli*, включая близкородственные варианты. Интересно, что в отдельных случаях удалось детектировать небольшие изменения в генетическом профиле бактерии, выделенной из одной особи, но из разных органов, что может свидетельствовать о появлении и последующем закреплении мутационных изменений в геноме бактерии при колонизации разных органов особи.

Заключение. Генотипирование изолятов *E. coli* методом ДРИМ позволило не только добиться высокой разре-

шающей способности по критерию дискриминационной способности (выявлено 14 штаммов в 29 изолятах), но и выявить незначительные изменения в генетическом профиле бактерий, колонизировавших разные органы больных птиц.

Литература

1. Борисенкова А.Н., Новикова О. Б., Оконецкий П. Флорфеникол в птицеводстве // Птицеводство. 2012. №3. С. 43-45.
2. Добрина М. Н. Нужен постоянный контроль сальмонеллеза // Животноводство России. 2011. №3. С. 11-13.

3. Щепеткина С.В., Новикова О.Б., Забровская А.В., Терлецкий В.П., Тыщенко В.И. Современные принципы антибиотикотерапии в птицеводстве. Изд-во ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ», Санкт-Петербург 2015, 160 с.

4. Hussein A.H., Ghanem I.A., Eid A.A. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from

broiler chicken flocks in Egypt // Avian Dis. 2013. Vol. 57. No. 3. P. 602-611.

5. Terletski V. P., Schwarz S., Carnwath J., Niemann H. Subtracted restriction fingerprinting — a tool for bacterial genome typing // BioTechniques. 2003. Vol. 34(2). P. 304-313. DOI: 10.2144/03342rr01.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Садчикова А.С., Иголкин А.С., Мазлум А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

Введение. Классическая чума свиней (КЧС) — высококонтагиозная инфекционная болезнь свиней вирусной этиологии, характеризующаяся геморрагическим синдромом, фибринозной пневмонией, колитом и высокой летальностью (до 100 %). Вирус РНК-содержащим и принадлежит роду Pestivirus семейства Flaviviridae. Генотипирование изолятов вируса КЧС осуществляется на основе нуклеотидных последовательностей 3-х переменных генов: 5'-UTR, гена белка E2, и гена NS5B. В зависимости от этого классифицируют 3 генотипа и 11 субгенотипов вируса КЧС (1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.2, 3.3, и 3.4). При этом внутри субгенотипа 2.1 выделяют 4 клада (подгруппы): (2.1a, 2.1b, 2.1c и 2.1d). Эпизоотическая ситуация по КЧС во многих странах мира остается неблагоприятной и возбудитель продолжает распространяться в различных комбинациях по генотипированию.

Несмотря на то, что в ряде стран КЧС была успешно ликвидирована, а для профилактики инфекции используются высокоэффективные вакцины, в том числе в РФ, где последняя вспышка данного заболевания регистрировалась в 2019 г. у домашних свиней и в 2020 г. в популяции дикого кабана, угроза эмерджентной трансграничной передачи остается, особенно на приграничных к неблагополучным территориям (напр. Приморский край РФ). Проведение оперативного пассивного мониторинга КЧС в популяции дикого кабана с использованием методов молекулярно-генетического анализа позволит своевременно реагировать на потенциальные угрозы для свиноводства.

Современные тест-системы на основе ПЦР-РВ имеют максимальную аналитическую чувствительность — $1,5 \pm 0,5$ Ig ККИД50/мл. Более высокий уровень аффинности праймеров, кДНК-мишени и биостабильности достигается модификацией олигонуклеотидов в LNA (замкнутая нуклеиновая кислота).

Цель и задачи. разработка высокочувствительного и специфичного для вируса КЧС мультиплексного анализа ОТ-ПЦР-РВ с использованием зонда Taqman, праймеров с модификацией LNA, а также с внутренним контрольным

образцом, который может применяться для молекулярной диагностики КЧС.

Материалы и методы. В данной работе исследовались штаммы и изоляты вируса для определения аналитической чувствительности разрабатываемой методики ОТ-ПЦР-РВ, такие как вакцинный штамм «СК» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), референс-штамм «Ши-мынь» и 12 изолятов вируса КЧС, выделенных на территории РФ в период с 1950-х годов по 2020 год, полученные из Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ» (ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Для определения аналитической специфичности метода использовали вирус АЧС (штамм «Arm 07»), РРСС (штамм «BD», изолят «Иркутский 2007»), вирусы болезни Ауески и вирусной диареи КРС.

Для подбора праймеров был проведен молекулярно-генетический и филогенетический анализы с определением консервативных участков генома. Зонды к целевому фрагменту КЧС были подобраны на зеленый флуоресцирующий канал (флуорофор FAM), а к внутреннему контрольному образцу — на crimson (флуорофор Cy5.5). Следующим шагом был выбор компонентов ПЦР-смеси и оптимизация условий реакции.

Выделение суммарной РНК из всех использованных образцов проводили с использованием набора реагентов «РИБО-сорб» для выделения ДНК/РНК из клинического материала (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) с добавлением внутреннего контрольного образца (бактериофаг MS2).

После оптимизации условий реакций для постановки ОТ-ПЦР-РВ был выбран набор «OneTube RT-PCR TaqMan» (ООО «ЕВРО ГЕН», РФ), который включает в свой состав готовую ПЦР-смесь и ревертазу Tm-MMLV.

Результаты. ОТ-ПЦР в реальном времени оптимизирован с использованием общего объема 25,0 мкл. По составленному протоколу смесь для постановки реакции рассчитывалась (из расчета на 1 пробу): смесь «OneTube RT-PCR TaqMan» 5,0 мкл; праймеры, специфичные к участку генома вируса КЧС (прямой и обратный), по 1,0 мкл (10

пмоль каждого); зонд 21, специфичный к участку генома вируса КЧС (на зеленый флуоресцирующий канал (FAM)) 0,5 мкл (5 пмоль), праймеры и зонд (на флуоресцирующий канал crimson), специфичные к бактериофагу MS2, по 0,5 мкл (10 мМ каждого); вода 5,0 мкл, и ревертаза — 1,0 мкл. К готовой смеси добавляется 10 мкл выделенного генетического материала. Температурный профиль: 25 мин при 40 °С (обратная транскрипция), 10 мин при 95 °С (инактивация обратной транскриптазы/активация Taq-полимеразы), затем первое циклирование (10 циклов), начиная с 10 сек 95 °С (денатурация), 40 сек 60 °С (отжиг праймеров), 10 сек 72 °С (элонгация) и второе циклирование (35 циклов с детекцией продуктов амплификации), начиная с 10 сек 95 °С (денатурация), 40 сек 55 °С (отжиг праймеров), 10 сек 72 °С (элонгация).

Проведена проверка валидируемых параметров методических рекомендаций, таких как воспроизводимость, специфичность и аналитическая чувствительность. Определен предел детекции для референтного штамма «Ши-мынь» вируса КЧС, исходный титр которого составлял 6,5 lg ККИД50/мл (разведение в 10⁻⁶, минимальный предел детекции составил 0,5lg), тем самым аналитическая чувствительность максимальная с точностью ± 0,5 lg ККИД50/мл. Воспроизводимость оценивали

по результатам регрессионно-корреляционного анализа, показавшего коэффициент детерминированности (R²) более 99,28 % (при p < 0.0001), что говорит о высокой воспроизводимости методики. Оценка специфичности показала отсутствие кросс-реактивности с РНК родственных пестивирусов и других гетерологичных вирусов свиней.

Заключение. Модификация праймеров LNA к фрагменту генома вируса КЧС позволила достичь высокой чувствительности (0,5 ККИД50/мл). В результате проведенного комплекса исследований разработаны «Методические рекомендации по выявлению генома вируса классической чумы свиней методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) с добавлением внутреннего контрольного образца». В методике отражены основные параметры проведения реакции и интерпретации полученных данных по выявлению РНК вируса КЧС. Данная методика воспроизводима и может быть использована при проведении диагностических исследований в ветеринарных лабораториях и научных центрах РФ. Основные валидационные параметры разработанной тест-системы на основе ОТ-ПЦР-РВ соответствуют требованиям ГОСТ ИСО 17025-2019.

SNP-БИОЧИП ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАПЛОТИПОВ АССОЦИИРОВАННЫХ С МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ БЫКОВ И МЕРТВОРОЖДЕНИЕМ КРУПНО-РОГАТОГО СКОТА ПОРОДЫ АБЕРДИН-АНГУС

Кочкин Р.О., Марзанова С.Н., Николаева М.А.

ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА имени К.И. Скрябина, иммунологии и биотехнологии, ФБЭ, Москва, Россия

Введение. В настоящее время в сельскохозяйственной диагностике для обнаружения моногенных заболеваний и хозяйственно-полезных признаков используют биочипы из-за их удобства и многофункциональности. Также они находят широкое применение в селекции, для отбора наиболее жизнеспособных и продуктивных особей. В рамках проекта студенческий стартап на тему: «Биочип для определения гаплотипов, ассоциированных с мясной продуктивностью и летальностью эмбрионов, для популяции КРС абердин-ангусской породы» ведется разработка гидрогелевого биочипа.

Материалы и методы. За основу прототипа взяты гидрогелевые биочипы Мирзабекова А.Д., состоящие из полимерной подложки с иммобилизованной матрицей композиций, содержащей флуоресцентные зонды. Каждая ячейка матрицы содержит уникальный зонд, содержащий свою собственную молекулу, распознающую ответную мишень в анализируемом образце.

На подложке имеется рабочий слой, который состоит из макропористого монолитного сополимера глицидилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата при их массовом соотношении (30:70) с иммобилизованными на нем афинными биологическими зондами.

В качестве микроносителя используется полиакрила-

мидный гидрогель (ПАА) процесс изготовления которого включает полимеризацию акриламидного мономера в присутствии перекиси аммония, как инициатора полимеризации. В процессе полимеризации акриламидные мономеры связываются с помощью двифункциональных кросс-связывающих агентов, таких как метиленбисакриламид или N,N'-метиленбисакриламид. Это приводит к образованию 3D-структуры гидрогеля, которая обладает высокой водоудерживающей способностью, что позволяет использовать его как матрицу для встраивания биомолекул, таких как ДНК или белки.

Также в составе был использован магнитный силикагель для удержания зондов на поверхности гидрогеля, в который входит непосредственно силикагель (трехмерной сети кремнезема SiO₂) и магнитные наночастицы различного происхождения, такого как ферриты или металлические частицы, обычно оксиды железа, такие как магнетит (Fe₃O₄) или гематит (Fe₂O₃).

Результаты исследований. Для подбора зондов использовали ПО «UGENE Unipro» и «Blast». На фланкирующий участок подбирали праймеры со стандартными требованиями, такими как специфичность, оптимальный GC-состав, температура отжига, длина ампликона.

На стадии ПЦР для амплификации использовали

мастер-микс, включающий в себя 0,4 мкМ каждого праймера, 0,12 mMdNTP, 1 мкМTaq-полимеразы, 3 mM MgCl₂, 50-100 нг ДНК, до 25мкл milliQ H₂O. Используемые флуоресцентные красители — FAM, ROX и Cy5. (λ=520 нм, λ=610 нм, λ=670 нм).

При гибридизации одноцепочечный флуоресцентно-меченный продукт образовывал высокостабильный гибридизационный комплекс только с полностью комплементарным иммобилизованным зондом, т.е. каждый нуклеотид изучаемой мишени образовывал гибридизационный дуплекс с соответствующим нуклеотидом в составе зонда.

Протокол изготовления биочипа состоял из следующих этапов. Для создания новой партии, лазером разрезали заготовку подложки в строго заданном порядке по определенным координатам. Далее на рабочий слой подложки иглы робота последовательно и в строго определенном порядке наносили в нужные места капли композиции ДНК-зонда и гидрогеля объёмом 0,1 нл., и выдерживали 2-16 ч при комнатной температуре и относительной влажности 75% (допускается нагрев до 37°C в течение 1-2 ч). Затем не прореагировавшие эпоксидные группы блокировали в буферном растворе, содержащем 50 mM этаноламин, 150 mM борной кислоты и 0.2% Tween 20 (pH 8,5) в течение 2 ч при комнатной температуре. Ячейки надёжно закрепляли на поверхности пластин, образуя ковалентную связь. После этого полученный чип готов к работе. Таким образом, формировали матрицу

ячеек полусферической формы, составляющих ядро биочипа.

На следующем этапе отмывали подложки, чтобы избавиться их от ненужных компонентов. Для этого использовали центрифуги и термостат. Дистиллированной водой промывали подложки от компонентов гидрогеля и молекулярных зондов, которые не прореагировали друг с другом.

На биочипы прошедшие контроль качества, монтировали гибридизационную камеру. В этой камере формировали реакционный объём, куда вносили анализируемый образец, молекулы которого взаимодействуют с зондами в ячейках биочипа. Камера снабжена герметичной крышкой, которая не даёт растворам высохнуть во время работы с биочипом. Биочипы производили в специальном боксе, имеющем избыточное давление, предотвращающее попаданию частиц снаружи.

Заключение. В ходе разработки тест-системы на основе гидрогелевого биочипа было обнаружено более 2,5 тыс. генетических маркёров, связанных как с хозяйственно-полезными признаками, так и с моногенными заболеваниями (например Osteopetrosis, Neuropathic hydrocephalus, Developmental Duplication, Contractural Arachnodactily, Arthrogyposis Multiplex). Из них были выбраны наиболее значимые и достоверные (60 ед.), для которых были подобраны и синтезированы праймеры и включены в ДНК — панель.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЛЯ БЫСТРОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Титов И.А., Нефедьева М.В., Колбасов Д.В.

Федеральный Исследовательский Центр Вирусологии и Микробиологии (ФГБНУ ФИЦВИМ), Вольгинский, Россия.

Введение. Африканская чума свиней (АЧС) — вирусное заболевание с высоким уровнем смертности, поражающее как домашних свиней, так и кабанов. АЧС наносит серьёзный экономический ущерб и является серьёзной проблемой для свиноводства. На сегодняшний день АЧС распространена в странах Африки, Европы и Азии [1]. Вследствие отсутствия методов лечения и эффективной вакцины, большую роль в контроле заболевания играет диагностика. В настоящее время существенное внимание уделяется разработке быстрых и чувствительных методов выявления вируса АЧС [2].

Исходя из вышесказанного, целью работы являлась разработка быстрого и чувствительного метода выявления генома вируса африканской чумы свиней на основе изотермической амплификации.

Материалы и методы. В качестве основы для разработки методики был выбран метод рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА). Этот метод позволяет производить амплификацию ДНК в изотермических условиях за счёт взаимодействия нескольких ферментов (рекомбиназа, изотермическая полимеразы и др.) и весьма широко

применяется в диагностике [3;4;5].

Олигонуклеотидные праймеры и ехо-зонд, специфичные к участку гена *CP204L* вируса африканской чумы свиней были подобраны на основе анализа нуклеотидных последовательностей геномов вирусов АЧС, имеющихся в международной базе данных Genbank. Постановку реакции рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА) осуществляли в приборе Т-8 (Аххин, Австралия), с использованием коммерческого набора TwistAmp™ RT exokit (Twist DX, Великобритания), согласно инструкции производителя. Температура амплификации составляла 39°C с перемешиванием на 4 минуте. Время амплификации составляло 20 минут.

В качестве стандартного образца для определения предела обнаружения фрагментов генома вируса АЧС методом РПА в реальном времени использовали синтезированный фрагмент двухцепочечной ДНК, который соответствовал целевой последовательности гена *CP204L* (длина 183 пары оснований). Количество копий синтезированной ДНК рассчитывали исходя из длины фрагмента и его концентрации с помощью онлайн сервиса DNA Copy Number and Dilution Calculator (<https://www>.

thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html). С целью определения чувствительности методики была произведена постановка реакции с серией десятикратных разведений стандартного образца от 5×10^6 до 5×10^0 копий/мкл. Для амплификации использовали 1 мкл приготовленных разведений.

Для определения специфичности реакции и её пригодности для выявления фрагментов генома вируса АЧС, использовали панель образцов ДНК, включающую в себя 25 образцов ДНК вируса АЧС, принадлежащего ко II генотипу, и 6 образцов — к I генотипу.

С целью сопоставления результатов разработанного метода с результатами ПЦР в режиме реального времени все образцы были также исследованы с помощью коммерческой тест-системы VDX ASFV qPCRkit, (Median Diagnostics, Корея).

Основные результаты. Чувствительность разработанной методики была определена трёхкратной постановкой реакции с серией десятикратных разведений стандартного образца от 1×10^6 до 1×10^0 . В результате предел детекции составил 5×10^1 копий/мкл. в течение 12 минут.

Исследование методом РПА в режиме реального времени образцов, содержащих ДНК вируса АЧС I и II генотипов позволило обнаружить присутствие фрагментов генома вируса АЧС в образцах в среднем за 6 минут. Корреляция между результатами, полученными методом РПА

и ПЦР в режиме реального времени составляет 100%. При этом среднее время получения результатов методом ПЦР в режиме реального времени составляет 49 минут.

Заключение. Разработанная методика выявления фрагментов генома вируса АЧС на основе РПА в режиме реального времени обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Методика позволяет выявлять геном вируса АЧС в короткие сроки по сравнению с ПЦР в режиме реального времени (в среднем 6 минут).

Список литературы.

1. Li Z, Chen W, Qiu Z, Li Y, Fan J, Wu K, Li X, Zhao M, Ding H, Fan S, Chen J. African Swine Fever Virus: A Review. Life (Basel). 2022 Aug 17;12(8):1255. doi: 10.3390/life12081255. PMID: 36013434; PMCID: PMC9409812.

2. Wang, F., Zhang, H., Hou, L., Yang, C., & Wen, Y. (2021). Advance of African swine fever virus in recent years. Research in veterinary science, 136, 535–539. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.04.004>

3. Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., & Armes, N. A. (2006). DNA detection using recombination proteins. PLoS biology, 4(7), e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>

4. Lobato, I. M., & O'Sullivan, C. K. (2018). Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. Trends in analytical chemistry : TRAC, 98, 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>

5. Daher, R. K., Stewart, G., Boissinot, M., & Bergeron, M. G. (2016). Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. Clinical chemistry, 62(7), 947–958. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245829>

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ В ФОРМАТЕ ИММУНОЧИПА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ВАКЦИНАЦИИ В ПТИЦЕВОДСТВЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИДКОЙ СЫВОРОТКИ И СУХОЙ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

Саушкин Н.Ю., Самсонова Ж.В., Осипов А.П., Преснова Г.В., Рубцова М.Ю.

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. В промышленном птицеводстве содержание большого количества птицы, сосредоточенного на ограниченной территории, требует постоянного соблюдения ветеринарно-санитарного режима и проведения профилактических мероприятий для предотвращения заноса и распространения инфекционных заболеваний различной этиологии. Частый и массовый контроль здоровья птицы диктует необходимость проведения вакцинопрофилактики и использования нескольких тест-систем для оценки уровня антител поголовья к ряду наиболее распространенных инфекций. Существующие иммунохимические тест-системы предлагают тестирование одновременно на одну инфекцию, что, ввиду необходимости контроля нескольких типов заболеваний, увеличивает затраты на диагностические мероприятия. Создание мультиплексных систем для использования в

ветеринарной практике с возможностью одновременно определения титра поствакцинальных антител на несколько инфекций является не только научно значимой, ввиду малочисленности исследований в данном направлении, но и актуальной практической задачей, отвечающей потребностям современного сельского хозяйства и ветеринарной диагностики.

Цель работы состояла в создании мультиплексной аналитической системы, позволяющей осуществлять одновременное количественное определение трех типов поствакцинальных антител в одной пробе. Подходом к реализации подобной системы является разработка мультиплексного иммуноферментного анализа в формате иммуночипа, который основан на иммобилизации нескольких специфических антигенов вирусов в виде микроматрицы на дне лунки ИФА план-

шета. Таким образом, при проведении анализа в одной лунке можно одновременно определить уровень антител к возбудителям нескольких заболеваний. Результат серологического контроля может быть полуколичественным (титрограмма) или количественным (титр антител) при использовании программного обеспечения для оценки интенсивности отдельных окрашенных зон иммуночипа.

Материалы и методы. В качестве анализируемых образцов использовали сыворотку и соответствующие образцы сухой цельной крови кур, полученные на пористых стекловолоконных носителях (ООО «УниверсиТест», Россия). Пробы были охарактеризованы с помощью коммерческих ИФА тест-систем (IDEXX, США и ВНИИЗЖ, Россия). В качестве антигенов для работы использовали очищенные инактивированные вирусные суспензии возбудителей болезни Ньюкасла, инфекционного бронхита и бурсальной болезни кур. Для нанесения дискретных зон антигенов на дно лунок полистиролового планшета использовали устройство для автоматического нанесения микрозон XactII™ Compact Microarray System (LabNEXT, США). Для численной оценки результатов анализа поверхность лунок сканировали и рассчитывали интенсивность окрашивания микрозон иммуночипа с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США), далее сопоставляли интенсивность окраски с титром исследуемых проб.

Основные результаты. Для разработки ИФА в формате иммуночипа были оптимизированы условия нанесения трех вирусных антигенов в виде дискретных зон на дне лунок полистиролового планшета. Для оптимизации формы пятна и воспроизводимости его

нанесения варьировали ряд параметров, таких как разведение антигена (вирусной суспензии), состав сорбционного и реакционного буферов, время/температура стадий высушивания и инкубации реагентов в лунках, параметры и способ автоматического нанесения микрозон. Полученный после всех оптимизаций иммуночип (6x6, размер микрозоны 350 мкм) использовали для проведения иммунохимической реакции. Совместно с НПП «Авивак» из птицеводческого хозяйства для анализа были отобраны образцы сывороток и соответствующих образцов цельной крови вакцинированных кур, высушенных на стекловолоконных носителях. Парные образцы жидкой сыворотки крови и сухой цельной крови были охарактеризованы с использованием коммерческих ИФА наборов двух производителей на три инфекционных заболевания (болезнь Ньюкасла, инфекционный бронхит, бурсальная болезнь кур). Для каждой из шести тест-систем наблюдалась высокая корреляция результатов между сухими и жидкими образцами. При тестировании образцов жидкой сыворотки и сухой цельной крови вакцинированных кур методом мультиплексного анализа на иммуночипе и стандартного ИФА также были получены сопоставимые данные, при этом при количественной оценке интенсивности окрашивания микрозон получены хорошие корреляции мультиплексного иммуноанализа с результатами классического ИФА для всех трех вирусных антигенов (Таблица). Было также показано, что при параллельном измерении образцов жидкой сыворотки и соответствующих образцов сухой цельной крови достигается высокая корреляция интенсивности окрашивания микрозон ($R^2 > 0,9$).

ТАБЛИЦА. ЗАВИСИМОСТЬ ИНТЕНСИВНОСТИ ОКРАШИВАНИЯ МИКРОЗОНЫ ИММУНОЧИПА (I) ОТ ТИТРА АНАЛИЗИРУЕМОЙ СЫВОРОТКИ В ИФА (T) (N=24)

Инфекционное заболевание	Уравнение корреляционной зависимости	Коэффициент корреляции R^2
Болезнь Ньюкасла кур	$I=0,0038*T+3,97$	0,81
Бурсальная болезнь кур	$I=0,0092*T-2,73$	0,90
Инфекционный бронхит кур	$I=0,0043*T+6,92$	0,76

Заключение. Разработан метод мультиплексного анализа специфических антител к трем видам вирусных возбудителей болезней птицы в формате иммуночипа, реализованный в виде микроматрицы дискретных зон на дне лунок ИФА планшета. При этом было показано, что в качестве биопроб для определения титра антител в формате иммуночипа возможно использование сухих образцов цельной крови кур, что исключает необходимость предварительного получения сыворотки. Принцип мультианализа в одной лунке позволяет проводить одновременное выявление антител на искомые инфекции, осуществлять количественную оценку нарастания титров антител, что особенно актуально для быстрого контроля иммунитета птицы в условиях ее короткого времени жизни и массового содержания. Использование видеоцифровых сканирующих систем и программной

обработки результатов мультиплексного анализа на иммуночипах дает возможность проводить экспресс-оценку титра антител сразу к нескольким инфекциям, кратно снижая затраты на тестирование проб. Более того, предлагаемый подход дает возможность создавать матрицы нанесенных антигенов определенного состава (штаммов возбудителей) с учетом эпизоотической ситуации в регионе (птицехозяйствах) и согласно используемым схемам вакцинации. В перспективе научно-методические основы создания иммунохимических методов в формате иммуночипа могут служить алгоритмом для решения других аналогичных задач мультиплексного определения антигенов или антител к возбудителям значимых инфекционных заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 22-74-00018.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ СВИНЕЙ В ХОЗЯЙСТВАХ РФ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-РВ

М.В. Тиманов, А.М. Тимина, М.В. Бирюченкова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных», Владимир, Россия

Введение. Появление новых инфекций — важное биоэкологическое явление в инфекционной патологии людей и животных. Для свиноводства потенциальную опасность могут представлять следующие недавно обнаруженные вирусы:

Альфакоронавирус свиней (SADS-CoV) и Дельтакоронавирус свиней (PDCoV) вызывают атрофический энтерит, протекающий в острой форме с клиническими проявлениями диареи, и являются причиной смерти новорождённых поросят.

Цирковирус свиней 3 типа (PCV3), как и обнаруженный ранее ЦВС2, связан с синдромом дерматита и нефропатии свиней, мультисистемным истощением, репродуктивными проблемами, миокардитами, респираторными заболеваниями и врожденным тремором.

Атипичный пестивирус (APPV) является возбудителем синдрома врожденного тремора типа А-II (СТ А-II) у поросят.

Сенекавирус А (SVA) может вызывать у свиней везикулярные поражения, неотличимые от таковых при ящуре. Кроме того, у поросят первой недели жизни наблюдают мышечную слабость, чрезмерное слюноотделение, гиперемиию кожи, неврологические проявления, диарею и внезапную смерть.

Новый коронавирус SARS-CoV-2 вызывает тяжёлую форму пневмонии у людей (COVID-19), но его распространение не ограничивается человеческой популяцией.

В подавляющем большинстве новые инфекции имеют зоогенное происхождение (основным резервуаром являются дикие животные). Перемещения людей, туризм и торговля также способствуют выходу возбудителей из природных пулов.

Таким образом, в мире наблюдается тревожная тенденция возрастания числа инфекционных болезней, вызываемых новыми, неизученными в достаточной степени вирусами.

Цель. изучение ситуации по новым вирусным болезням свиней в России с использованием ПЦР-РВ.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали биоматериал от свиней из свиноводческих хозяйств РФ. Анализ проб проводили на базе референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ» с помощью разработанных методов ПЦР-РВ.

Результаты. В течение 2019-2021 гг. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» поступило 5873 образцов биоматериала от свиней из 112 хозяйств РФ. Используя метод ПЦР-РВ, органы и ткани свиней исследовали на наличие вирусов SADS-CoV, PDCoV, PCV3, APPV, SVA и SARS-CoV-2. Для анализа брали материал от животных с любыми клиническими проявлениями заболевания, а также материал от клинически здоровых особей. В подавляющем большинстве случаев в биоматериале от свиней был обнаружен цирковирус свиней 3 типа (56% исследуемых проб из 98 хозяйств). Исследования, проведённые с использованием количественной ПЦР-РВ, показали прямую зависимость развития того или иного симптомокомплекса от уровня вирусной нагрузки. Концентрация вируса в тканях порядка 108-1012 копий/мл соответствовала мультисистемному истощению или респираторным нарушениям у свиней. У клинически здоровых животных содержалось менее 105 — 106 копий генома ДНК/мл. РНК атипичного пестивируса была обнаружена в 4 % исследуемых проб. Инфицированными оказались 10 хозяйств из Белгородской, Воронежской, Липецкой, Новосибирской, Псковской, Орловской, Кировской области и Краснодарского края. Однако, в этих хозяйствах признаков врожденного тремора у поросят не наблюдали. Сенекавирус А в наших исследованиях мы обнаружили лишь однажды в образцах головного мозга и суставов поросят (Челябинская область). Вирусы PDCoV, SADS-CoV и SARS-CoV-2 у свиней в российских хозяйствах на данный момент не были выявлены.

Выводы. ПЦР-РВ позволяет выявлять наличие геномов указанных в работе возбудителей вирусных инфекций, циркулирующих в популяциях свиней на территории Российской Федерации.

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОДИАГНОСТИЧЕСКОГО АЛГОРИТМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ПРОВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ ПРИ ЛЕЙКОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Козырева Н.Г., Абашин И.Ю., Степанова Т.В.

ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва, Россия

Актуальность. Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС, *bovine leukemia virus, BLV*) является представителем дельтаретровирусов семейства Retroviridae и индуцирует злокачественное лимфопролиферативное

заболевание — энзоотический лейкоз. Лейкоз КРС как латентная ретровирусная инфекция сельскохозяйственных животных наносит экономический ущерб животноводческой отрасли и является одной из наиболее важных

проблем ветеринарной медицины.

В рамках диагностики ВЛКРС провирусная нагрузка (ПН) является прогностическим показателем количества провируса в организме при инфекционном заболевании, который обычно определяется по количеству вирусных частиц в жидкостях организма, в частности, в плазме крови/цельной крови. Анализ ПН определяет ДНК вируса, учитываемых в количестве копий ДНК на миллилитр жидкости. Колебания ПН показывают, как быстро могут либо прогрессировать иммунодефицитные состояния у макроорганизма в ближайшее время либо замедляться темпы распространения инфекции при завышении/снижении значений ПН. При этом, молекулярные техники (например, полимеразная цепная реакция, ПЦР), которые обнаруживают интегрированный провирусный геном ВЛ в геноме хозяина, используются в дополнение к серологическим методам диагностики инфекции. Количественный анализ методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) выполняется при сравнении значений пороговых циклов *Ct* анализируемых и калибровочных образцов, где достигается широкий линейный диапазон (ЛД) при максимально низких погрешностях, что позволяет рассматривать данный способ в качестве приоритетного инструмента определения концентрации ДНК в исследуемых образцах.

Цель и задачи. Оценить количество, генетический статус провирусов лейкоза КРС, выделенных от животных и провести корреляционный анализ связей между некоторыми показателями изучаемого инфекционного процесса на основе методов генодиагностики.

Материалы и методы. Исследовали образцы крови коров: 371 телочка (от 15 до 45 дней), 293 нетели (не старше 2-х лет), 10 коров (2-7 лет) из хозяйства Московской области в количестве 674 проб. В качестве стандарта для целевого гена ВЛ использовали изолят ВЛ (*BLV-FLK*), выделенный из клеточной линии *FLK*. Провирусную ДНК выделяли из 100 мкл крови с помощью коммерческих наборов «ДНК-Сорб-В», «Рибо-Преп» отечественного про-

изводства. Количество ДНК ВЛКРС и эффективность ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) оценивали с применением метода десятикратных последовательных разведений генно-инженерной конструкции — плазмидного препарата *pBLVpol_kl7*. ПЦР-РВ проводили в мультиплексном и количественном вариантах. Ампликоны получали с помощью «гнездовой» ПЦР с электрофоретической детекцией. Нуклеотидную последовательность изолятов определяли методом секвенирование ДНК по Сэнгеру с дальнейшим филогенетическим анализом.

Основные результаты. Приготовлены последовательные десятикратные разведения плазмидного препарата: 10^{-1} до 10^{-10} . Проведен анализ значений критериев построения калибровочной прямой: угол наклона (*k*), пределы погрешности: среднеквадратичное отклонение (СКО), коэффициент корреляции (*R2*), а также эффективности реакции (*E*), средние величины которых составили: *k* = -3,01; *R2*=0,998; СКО=0,02; *E* = 98%. Выявлен оптимальный ЛД системы ДНК калибраторов в пределах $7,26 \times 10^2$ — $7,26 \times 10^9$ копий/мл. ПН для изолята BLV-FLK составила $1,15 \times 10^6$ копий/мл. Поставлена серия экспериментов по испытанию алгоритма определения количества провируса в крови крупного рогатого скота с представленными в таблице результатами. Измерена ПН у 18 животных разных возрастных групп, диапазон которой составил $2,02 \times 10^4$ - $8,38 \times 10^6$ копий/мл. Обнаружено завышение ПН в 2,93 раза у нетелей, чем у телят; у коров с условно высокими количественными значениями порядка $>10^5$ копий/мл превышение таковых у телят приблизительно в 10^2 раз, нетелей до 2-х лет приблизительно в 40 раз.

Охарактеризованы нуклеотидные последовательности локуса *env* 5 новых изолятов ВЛКРС от взрослых коров с определением генетического статуса для каждого — вариант GIV (5/5, 100%); установлены темпы дивергенции нуклеотидных последовательностей в ДНК изолятов ВЛКРС, которые в среднем составили $1,3 \pm 0,3\%$.

ТАБЛИЦА. ОЦЕНКА ПРОВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ В КРОВИ ИССЛЕДУЕМЫХ ЖИВОТНЫХ

Животные	Возраст	Средние значения ПН, копий/мл	Количество животных (доля в %)	Генотип, G	Количество животных (доля в %)	Средние значения ПН по генотипам, копий/мл
Телята	2-4 месяца	$1,30 \times 10^6$	6 (33%)	VII	3 (19%)	$3,58 \times 10^5$
				IV	3 (19%)	$2,25 \times 10^6$
Нетели	1-2 года	$3,83 \times 10^6$	7 (39%)	IV	5 (31%)	$3,60 \times 10^6$
Коровы	2-7 лет	$1,50 \times 10^8$	5 (28%)	IV	5 (31%)	$1,50 \times 10^8$

Заключение/выводы. Подобраны оптимальные параметры системы калибровочных стандартов с соответствующим ЛД: $7,26 \times 10^2$ — $7,26 \times 10^9$ копий/мл.

Получены новые знания о первичной нуклеотидной последовательности 5 изолятов ВЛКРС. Проанализирова-

но генетическое разнообразие ВЛКРС: изоляты сгруппировались по гену *env* с представителями генотипа GIV с темпами внутригрупповой дивергенции, не превышающей средние внутригрупповые дивергенции по собственной БД ВИЭВ. При этом, в процессе ранее проводимого и теку-

щего анализа генетического статуса у 6 телят выявлено наличие двух генотипов вируса GVII и GIV — гетерогенная популяция патогена; у 5 нетелей обнаруживается гомогенная популяция вируса с наличием IV генетического варианта; у 5 коров также выявлен IV генотип ВЛКРС.

На основе анализа корреляционных связей между некоторыми характеристиками инфекционного процесса обнаружено, что уровень ПН выше у нетелей, чем у телят, защищенных на фоне колострального/приобретенного иммунитета (период элиминации материнских антител приблизительно до 6-8 месяцев); у повторнородящих молочных коров выше, чем у не рожавших особей; в крови

животных с генотипом GIV выше в 167 раз относительно таковых с генетическим вариантом GVII ВЛКРС. Интересно, что в группе телят, где выявлена гетерогенная популяция ВЛКРС, ситуация повторилась и превышение ПН в сторону GIV варианта составило 6,3 раза.

Учитывая малочисленную выборку животных, планируется продолжать исследования в данном направлении с целью проработки эффективных алгоритмов с помощью соответствующих диагностических инструментов в рамках программ по контролю лейкозной инфекции у крупного рогатого скота и накопления статистических данных с выявлением возможных тенденций.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ КЛОСТРИДИЙ ВИДОВ *C. SPOROGENES*, *C. PERFRINGENS* И *C. SORDELLII*

Нефедченко А.В., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Судоргина Т.Е., Котенева С.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН, Краснообск, Россия)

Введение. В последние годы в нашей стране выросла частота проявления клостридиозов крупного рогатого скота, обусловленная интенсификацией животноводства, направленной на повышение молочной продуктивности коров, которую часто осуществляют на фоне несбалансированных рационов кормления. Размножаясь на слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, клостридии вызывают некроз клеток эпителия, что способствует проникновению в кровяное русло продуцируемых ими токсинов и развитию тяжелых патологических процессов в организме [1]. В связи с быстротечностью инфекционного процесса, высокой токсигенной активностью возбудителей и обширностью поражения органов и тканей организма, лечение таких животных часто оказывается бесперспективным и высокопродуктивных особей приходится выбраковывать [2]. В организме животных помимо патогенных видов, постоянно обитают множество других видов, относящихся к нормальной микрофлоре кишечника и только в редких случаях способны вызывать развитие гнойной инфекции или усиливать патогенность других клостридий [3]. Следовательно для постановки правильного диагноза необходимо дифференцировать выделенные виды клостридий, что бактериологическими методами проводить затруднительно. Определение генов токсинов молекулярно-генетическими методами является более быстрым и надежным методом дифференциации изолятов клостридий.

Цель. Разработка методики быстрого типирования клостридий видов *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens* и *Clostridium sordellii* на основе метода ПЦР и изучение частоты выделения этих бактерий от крупного рогатого скота.

Материалы и методы. В работе исследовали органы от больных животных. Предварительно проводили выделение культур клостридий на питательных средах. Выделение ДНК проводили набором «Рибо-преп»

(Amplisens, ФБУН «ЦНИИЭ») согласно инструкции производителя. ПЦР проводили на амплификаторе «CFX 96» («BioRad», США), детекцию осуществляли в реальном времени. ПЦР-ПДРФ анализ фрагмента гена 16S рНК со специфичными для рода праймерами использовали для типирования выделенных изолятов клостридий. Секвенирование ПЦР-фрагментов гена 16S рНК проводили для подтверждения результатов исследований с использованием набора Big Dye Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit на амплификаторе GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystem, США) и автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer.

Результаты и обсуждение. Всего в работе было исследовано 70 проб биоматериала, полученных в 2023 году. Из них было выделено и типировано по морфологии и биохимическим свойствам 42 изолята клостридий, из которых по 11 относились к *C. perfringens* и *C. sporogenes*, 10 к *C. sordellii*. Остальные изоляты относились к *C. botulinum*, *C. histolyticum*, *C. haemolyticum* и *C. septicum*, *C. aerotolerans*, *C. pupuleti*. Видовая принадлежность всех изолятов была подтверждена с помощью ПЦР-ПДРФ анализа и изучения нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рНК.

На основании литературных данных и анализа нуклеотидных последовательностей, опубликованных в базе данных GenBank, были выбраны три пары праймеров и зондов для амплификации фрагментов генов *gerKA C. sporogenes*, *plc C. perfringens* и *NanS C. sordellii*. Был проведен ряд экспериментов по определению рабочих концентраций праймеров и зондов, обеспечивающих необходимую чувствительность анализа, оптимизированы условия проведения ПЦР. Специфичность выбранных олигонуклеотидов проверяли с использованием штаммов других видов клостридий и бактерий.

Также сравнили эффективность типирования клостридий при исследовании проб биоматериала от живот-

ных при непосредственном исследовании и после получения смешанных культур на питательной среде.

Чувствительность разработанной реакции составила при исследовании чистых культур — не менее 102 КОЕ/мл, а при исследовании 10% суспензий органов — не менее 105 КОЕ/мл. В сравнении с непосредственным исследованием проб биоматериала, в смешанных культурах, выделенных из этих проб на питательных средах, количество положительных результатов было выше (37 и 53%, соответственно) и чаще выявлялись ассоциации клостридий (*C. sporogenes* в сочетании с *C. perfringens* или *C. sordellii*).

Заключение. Использование разработанного метода ПЦР позволяет быстрее и эффективнее проводить диагностику клостридиозов крупного рогатого скота. Для этого необходимо предварительно получить смешанную

культуру на питательной среде и ее исследовать в ПЦР. Последующее изучение молекулярно-генетических характеристик выявленных изолятов клостридий на наличие генов токсинов позволит определить их потенциальную патогенности и роль в развитии болезни.

Работа проведена в рамках проекта РНФ № 23-26-00009.

Литература

1. Глотова Т.И., Терентьева Т.Е., Готов А.Г. Возбудители и возрастная восприимчивость крупного рогатого скота. Сибирский вестник с.-х. науки. 2017; 47(1):90 — 96.

2. Капустин А.В., Моторыгин А.В., Букова Н.К. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота. Вестник ветеринарии. 2013; 1(64):71 — 73.

3. Silva R.O.S., Uzal F.A., Oliveira Jr C.A., Lobato F.C.F. Clostridial Diseases of Animals. John Wiley & Sons, Ltd.; Hoboken, NJ, USA. Gangrene Gas (Malignant Edema). 2016; 243 — 254.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СТРАТЕГИИ ПЦР-ПДРФ-ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИРУСА БЫЧЬЕГО ЛЕЙКОЗА

Гильманов Х.Х., Вафин Р.Р.

Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук, Москва, Россия

Введение. Вирус бычьего лейкоза (ВБЛ, от англ. BLV — Bovine leukemia virus) — это РНК-содержащий вирус рода *Deltaretrovirus* семейства *Retroviridae*, инфицирующий преимущественно крупный рогатый скот [1].

До недавнего времени было известно о существовании 12 генотипов ВБЛ [2], идентифицируемых как филогенетическим анализом нуклеотидных последовательностей локуса *env*-гена возбудителя, так и с использованием актуализированной стратегии ПЦР-ПДРФ-генотипирования [3].

Открываемые в ходе поисковых исследований новые знания о генетическом многообразии изучаемого вируса требуют усовершенствования молекулярно-генетических подходов к его идентификации, в частности развиваемой стратегии типизации ВБЛ на основе ПЦР-ПДРФ-анализа [4].

Цель исследования заключалась в усовершенствовании стратегии ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ в контексте ее согласованности с филогенетической классификацией возбудителя и систематизированных знаний о его генетическом разнообразии.

Материалы и методы. Работа проведена в лабора-

тории лейкозологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Поиск, выравнивание и филогенетический анализ депонированных в GenBank NCBI секвенированных нуклеотидных последовательностей локуса *env*-гена изолятов ВБЛ, ограниченных праймерами 2-го раунда «гнездовой» ПЦР [3], выполняли с помощью программ BLAST, CLUSTALW и MEGA-4.

Основные результаты. После проведения биоинформационного поиска последовательностей локуса *env*-гена ВБЛ, депонированных в базе данных GenBank NCBI, их выравнивания и филогенетического анализа, была определена генотипическая принадлежность не менее чем 1148 изолятов изучаемого вируса [4].

В сравнении с предыдущей актуализацией стратегии ПЦР-ПДРФ-генотипирования 1110 изолятов 12 известных на тот момент генотипов ВБЛ [3], она расширилась в общей сложности на 33 комбинации ПЦР-ПДРФ-профилей (с 68 до 101) [4].

Количество и наименование установленных комбинаций ПЦР-ПДРФ-профилей ВБЛ, сгенерированных 7 подобранными рестриктазами (*PvuII*, *SspI*, *HphI*, *HaeIII*, *BstYI*, *DdeI* и *HruCN4III*), представлены в таблице.

ТАБЛИЦА. КОМБИНАЦИИ ПЦР-ПДРФ ПРОФИЛЕЙ ГЕНОТИПОВ ВБЛ

Генотип ВБЛ	Количество комбинаций	Наименования комбинаций
1	17	K1-17
2	5	K18-22
3	5	K23-27
4	19	K28-46
5	3	K47-49

6	14	K50-63
7	20	K64-83
8	6	K84-89
9	2	K90-91
10	7	K92-98
11	1	K99
12	1	K100
13	1	K101

При этом два представителя 101-ой комбинации (изоляты 33392_2012 и 25633_2013), первоначально причисленные ко 2-му генотипу, были отнесены нами к новому 13-му генотипу ВБЛ [4].

Предложенный ранее японскими исследователями в 2019 году [5] метод ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ мог идентифицировать 90,4% изолятов возбудителя с помощью 7 эндонуклеаз рестрикции (*BmrI*, *AluI*, *HphI*, *TaqI*, *PvuII*, *BamHI* и *MseI*). Усовершенствованная же нами стратегия обладает более высоким потенциалом идентификации при использовании того же количества рестриктаз, но преимущественно другого набора (*PvuII*, *SspI*, *HphI*, *HaeIII*, *BstYI*, *DdeI* и *HpyCH4III*) [4].

Дополнение разработанной нами стратегии ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ еще одной эндонуклеазой рестрикции *AluI* может обеспечить полную согласованность с современной филогенетической классификацией благодаря эффективному различению схожих комбинаций ряда генотипов [4].

Заключение. Усовершенствованная стратегия ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ, включающая 7 эндонуклеаз рестрикции (*PvuII*, *SspI*, *HphI*, *HaeIII*, *BstYI*, *DdeI* и *HpyCH4III*), имеет более высокий потенциал идентификации по сравнению с ближайшим аналогом, который использует такое же количество ферментов, но преимущественно другого состава. Для обеспечения полной согласованности с современной филогенетической классификацией разрабатываемую стратегию генотипирования ВБЛ можно дополнить еще одной рестриктазой — *AluI*, которая способна различать схожие комбинации ПЦР-ПДРФ-профилей ряда генотипов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-76-10011, <https://rscf.ru/>

[project/22-76-10011/](https://rscf.ru/project/22-76-10011/)

Список использованной литературы:

1. Донник, И.М. Лейкоз крупного рогатого скота — диагностика, оздоровление, антропозоонозный потенциал (История вопроса) (Обзор) / И.М. Донник, М.И. Гулюкин, В.А. Бусол, Л.В. Коваленко, А.М. Коваленко // Сельскохозяйственная биология. 2021. Т. 56. № 2. С. 230-244. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.2.230rus>
2. Sultanov, A. Molecular characterization of Bovine leukemia virus with the evidence of a new genotype circulating in cattle from Kazakhstan / A. Sultanov, M. Rola-Luszczak, S. Mamanova, A. Rylo, Z. Osiński, M.A. Saduakassova, E. Bashenova, J. Kuźmak // Pathogens. 2022. Vol. 11(2). P. 180. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020180>
3. Вафин, Р.Р. Стратегия ПЦР-ПДРФ-генотипирования BLV и её соответствие филогенетической классификации / Р.Р. Вафин, Х.Х. Гильманов, П.Н. Шастин, В.А. Савинов, С.В. Лопунов, А.М. Гулюкин // Ветеринария и кормление. 2023. № 2. С. 15–19. <https://doi.org/10.30917/АТТ-ВК-1814-9588-2023-2-4>
4. Вафин, Р.Р. Усовершенствованная стратегия ПЦР-ПДРФ-генотипирования BLV и ее согласованность с филогенетической классификацией / Р.Р. Вафин, Х.Х. Гильманов, П.Н. Шастин, В.А. Савинов, С.В. Лопунов, А.М. Гулюкин // Ветеринария и кормление. 2023. № 3. С. 14–19. <https://doi.org/10.30917/АТТ-ВК-1814-9588-2023-3-4>
5. Nishikaku, K. Broadly applicable PCR restriction fragment length polymorphism method for genotyping bovine leukemia virus / K. Nishikaku, R. Ishikura, N. Ohnuki, M. Polat, Y. Aida, S. Murakami, T. Kobayashi // Journal of Veterinary Medical Science. 2019. Vol. 81(8). P. 1157-1161. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0603>

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПЦР С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ С ЦЕЛЬЮ АМПЛИФИКАЦИИ МАРКЕРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОМА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Чернышев Р.С., Сидоренкова М.С., Садчикова А.С., Иголкин А.С., Мазлум А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

Введение. Одним из важнейших инструментов исследования вируса АЧС является молекулярно-генетический анализ, основанный на секвенировании определенных маркерных областей генома, состоящего из 170-193 т.п.н. и

содержащего 150-189 открытых рамок считывания (ОРС). В мире определены 24 генотипа вируса АЧС на основе анализа нуклеотидной последовательности длиной 475 п.н. С-конца гена B646L, кодирующего капсидный белок vp72.

В связи с преобладанием II генотипа вируса АЧС в Европе и выявлением различных субтипов среди циркулирующих изолятов, Gallardo C. et al., 2023 и Mazloum A. et al., 2023 рекомендован метод субгенотипирования с использованием нескольких локусов, позволяющий выделить 25 генетических кластеров внутри генотипа II на основе различных геномных маркеров. В недавнем обзоре было выделено шесть основных (B646L, CVR гена B602L, межгенные области I73R/I329L и MGF 505 9R/10R, K145R и O174L) и семь дополнительных (межгенные области A179L/A137R и C315R/C147L, I267L, MGF 505 5R, MGF 110 7L, MGF 505 9R, MGF 360 10L) генетических маркеров изменчивости, которые и были рекомендованы для характеристики изолятов вируса АЧС II генотипа. С целью проведения филогенетического анализа и молекулярно-эпизоотологической кластеризации новых изолятов вируса АЧС необходимо разработать протоколы амплификации маркерных последовательностей генома для последующего секвенирования по Сэнгеру. Классическим методом в таких случаях является проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией и последующей экстракцией целевых нуклеотидных участков из агарозного геля.

Цель и задачи — дизайн праймеров, оптимизация состава, концентрации компонентов ПЦР-смеси и температурно-временного профиля ПЦР для амплификации

маркерных фрагментов генома вируса АЧС (B646L, I267L, K145R, O174L, MGF 505 5R, IGR I73R/I329L, MGF 505 9R/10R), как важного этапа пробоподготовки (обогащения ДНК) к секвенированию по Сэнгеру.

Материалы и методы. Дизайн праймеров выполнен, исходя из литературных данных, и с помощью NCBI-primer design tool на основе полногеномной последовательности штамма Georgia 2007/1 (FR682468.2). В качестве матрицы для ПЦР использовали геномную ДНК референс-штамма Arm 07 вируса АЧС II генотипа. Выделение ДНК из культуральной суспензии вирусосодержащего материала осуществляли методом нуклеосорбции с использованием набора «ДНК-сорб В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Реакционная ПЦР-смесь содержала компоненты от производителя Thermo Fisher Scientific (Литва). Синтез олигонуклеотидов выполнялся ООО «Синтол» (Россия). ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе Mastercycler Gradient (Eppendorf, Германия). Продукты реакции анализировали с помощью горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия при силе тока 50 мА и напряжении 100 В при экспозиции 40 минут.

Результаты. Наименование и олигонуклеотидная последовательность праймеров, длина амплифицируемого фрагмента представлены в таблице.

Наименование праймера	Нуклеотидная последовательность (5'– 3')	Оптимальная температура отжига, °С	Длина фрагмента, п.н.	Источник
B646L Forward	GGC-ACA-AGT-TCG-GAC-ATG-T	50-60	478	[1]
B646L Reverse	GTA-CTG-TAA-CGC-AGC-ACA-G			
I267L Forward	TTG-GAC-AAA-TTG-CGT-TGC-GA	50-57	337	Представлены впервые
I267L Reverse	AAA-TGC-GAC-CGT-CCA-GAA-CT			
K145R Forward	GCA-GCT-TTA-CCG-CAG-CAT-AC	50-62	501	Представлены впервые
K145R Reverse	AAG-AGT-AGG-TGG-GCG-CTT-TC			
O174L Forward	TGG-CTC-AGA-CGA-TAT-TTC-AA-CTC	52-62	673	[2]
O174L Reverse	GCC-TCC-ACC-ACT-TGA-ACC-AT			
CVR Forward	AAG-CTC-ATT-AGG-CAC-ATT-TAA-TGT-TTT-TT-GC	50-61	459	[3]
CVR Reverse	CTG-CAG-GAA-TGG-ATG-CCT-TC			
MGF 505 5R Forward	TAC-GCT-TCT-TTT-CAA-TCA-TCA-T	52-57	641	[2]
MGF 505 5R Reverse	AAA-TTA-ACA-GTT-GTT-TGC-CTT-C			
IGR I73R/I329L Forward	CCATTATCCCCGCTTTGG	53-62	356	[3]
IGR I73R/I329L Reverse	TCGTCATCCTGAGACAGCAG			
MGF 505 9R/10R Forward	AGA-AAC-CGC-AGA-TGA-ATG-TA	52-60	552	[4]
MGF 505 9R/10R Reverse	TAC-AGC-CCT-AGT-TGT-TGA-AG			

В процессе оптимизации условий реакции определены температурно-временной профиль и количественный состав ПЦР-смеси.

Реакционная смесь с итоговым объемом 20 мкл содержала 2 мкл 10x DreamTaq-буфера, 0,5 мкл 25 mM-раствора MgCl₂, 1 мкл 10 mM-раствора каждого dNTP, 1 мкл (10 пмоль) прямого (forward) и 1 мкл (10 пмоль) обратного (reverse) праймеров, 0,2 мкл DreamTaq ДНК-полиме-

разы (5 ед./мкл), 9,5 мкл воды свободной от нуклеаз и 5 мкл ДНК-матрицы. Программа амплификации включала в себя этапы общей денатурации 98 °С 5 минут, 35 циклов собственно ПЦР (денатурация 98 °С 45 секунд, отжиг праймеров 55 °С 30 секунд, элонгация 72 °С 60 секунд) и дополнительную элонгацию 72 °С 5 минут. Оптимальная температура отжига праймеров, определенная в градиенте на амплификаторе Mastercycler Gradient, представлена

в таблице. Поскольку для всех фрагментов подходящей температурой отжига являлась 55 °С, она была признана универсальной для проведения ПЦР на все экспериментальные маркерные участки генома вируса АЧС.

Заключение. В связи с регулярной нотификацией вспышек АЧС на территории Российской Федерации назревает необходимость проведения референтных научных исследований, направленных на субгенотипирование изолятов внутри II генотипа, с целью изучения молекулярной эволюции и циркуляции различных генетических групп данного возбудителя. Разработанный протокол ПЦР с электрофоретической детекцией дает возможность амплифицировать маркерные области генома вируса АЧС для их последующего секвенирования, молекулярно- и филогенетического анализов, географической кластеризации и пространственно-временного исследования.

Список литературы. 1) Bastos, A.D.; Penrith, M.L.; Cruciere, C.; Edrich, J.L.; Hutchings, G.; Roger, F.; Couacy-

Hymann, E.G.; R Thomson, G. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. Arch. Virol. 2003, 148, 693–706. 2) Mazur-Panasiuk, N.; Walczak, M.; Juskiewicz, M.; Woźniakowski, G. The spillover of African swine fever in Western Poland revealed its estimated origin on the basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR I73R/I329L genomic sequences. Viruses 2020, 12, 1094. 3) Gallardo, C.; Fernández-Pinero, J.; Pelayo, V.; Gazeaev, I.; Markowska-Daniel, I.; Pridotkas, G.; Nieto, R.; Fernández-Pacheco, P.; Bokhan, S.; Nevolko, O.; et al. Genetic variation among African swine fever genotype II viruses, eastern and central Europe. Emerg. Infect. Dis. 2014, 20, 1544. 4) Elsukova, A.; Shevchenko, I.; Varentsova, A.; Zinyakov, N.; Igolkin, A.; Vlasova, N. African swine fever (ASF), intergenic region, 9R/10R, NGS, tandem repeat sequences in the intergenic region MGF 505 9R/10R is a new marker of the genetic variability among ASF Genotype II viruses. In Proceedings of the EPIZONE, 10th Annual Meeting 2016, Madrid, Spain, 27–29 April 2016.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА А СУБТИПА Н5 У ПТИЦ, В ТОМ ЧИСЛЕ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА А ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КЛАДЫ 2.3.4.4В

Шуряева А.К., Давыдова Е.Е., Толоконцева А.А., Полякова В.А., Лупарев А.Р., Девятков А.А., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Вирус гриппа А субтипа Н5 вызывает заболевания различных видов птиц, а также потенциально опасен для других видов животных и человека из-за способности некоторых штаммов к преодолению межвидовых барьеров и возникновению новых высокопатогенных штаммов. В последние годы неоднократно регистрировались случаи заражения высокопатогенным гриппом субтипа Н5 с высокой смертностью у человека и других млекопитающих. В связи с этим своевременное выявление случаев распространения вируса гриппа А Н5 субтипа среди птиц имеет большое значение для сдерживания потенциальных угроз пандемии высокопатогенного гриппа Н5.

Так, в 2022–23 гг в ряде стран, в том числе и в России, были зарегистрированы массовые вспышки заболевания среди домашней и сельскохозяйственной птицы, диких птиц и млекопитающих, вызванные вирусом птичьего гриппа А субтипа Н5, принадлежащего генетической кладе 2.3.4.4b. С 2022 года Всемирная Организация Защиты Животных зафиксировала беспрецедентное распространение гриппа птиц данной клады среди млекопитающих из 10 стран на трех континентах, поражающих как сухопутных, так и морских млекопитающих, в общей сложности инфицировано не менее 26 видов млекопитающих, включая норок, лисиц, тюленей, морских львов, кошек и собак. У зараженных животных наблюдались неврологические и респираторные симптомы с достаточно высокой смертностью.

С целью предотвращения дальнейшего распространения высокопатогенного вируса гриппа, необходимы качественные высокочувствительные методики, способные эффективно выявить в том числе генотипы вируса, которые

вызывали недавние вспышки заболевания.

Цель и задачи. Разработка методики для выявления вируса гриппа А субтипа Н5 с дифференциацией высокопатогенной генетической клады 2.3.4.4b, вызвавшей в последние годы массовые вспышки заболевания среди птиц и млекопитающих.

Материалы и методы. Для выбора диагностических праймеров и зондов было построено множественное выравнивание последовательностей гена гемагглютинина вируса птичьего гриппа А субтипа Н5 в программе Mega 11, алгоритм Clustal W и выбраны наиболее консервативные участки. Дизайн праймеров и зондов проводили в соответствии со стандартными требованиями к выбору олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов.

Экстракция РНК из образцов биологического материала птиц (мазки из клоаки, ротоглотки, тканевой (аутопсийный) материал трахеи и легких, селезенки, головного мозга, воздухоносных мешков, кишечника, сердца, почек, мазки биологического материала на транспортных ФТА картах) проводилось с помощью набора реагентов Рибо-преп-ВЕТ (ФГБУ «ЦСП» ФМБА, Россия).

В качестве внутреннего контрольного образца (ВКО) использовали искусственно синтезированную рекомбинантную последовательность РНК, заключенную в оболочку ms2-фага. Положительный контрольный образец (ПКО) представляет собой смесь рекомбинантных РНК, содержащую целевой участок генома вируса гриппа субтипа Н5, а также целевой участок генома вируса гриппа субтипа Н5 генетической клады 2.3.4.4b, в оболочке бактериофага ms2. Концентрацию РНК ВКО и ПКО измеряли методом цифровой

капельной ПЦР с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, США).

Аналитическую чувствительность оценивали на модельных образцах биологического материала с добавлением разведений положительного контрольного образца. Аналитическую специфичность оценивали на панели РНК штаммов вируса гриппа, включая штаммы вируса гриппа А (H1N1) pdm (А/С.-Петербург/НИИГ-94/20) (1:32 ГА), вируса гриппа А (H2N3) (А/Утка/Германия-1215/73) (1x10^{5,5} LD50/мл), вируса гриппа А (H3N2) (А/Красноярск/НИИГ-20/21) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H5N1) (А/Скворец/233/07/1/2011) (1:256 ГА), вируса гриппа А (H5N1) (А/NIBRG/14) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H5N3) (А/duck/Moscow/4971/13) (1:256 ГА), вируса гриппа А (H7N3) (А/Mallard/NT/12/2002) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H7N7) (А/Equine/Corbora/5/1976) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H7N9) (А/Anhui/1/2013) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H9N2) (А/НК/1073/1999) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H9N2) (А/Чирок/Колотун/Приморье/3628/2002) (1:32 ГА), вируса гриппа А (H10N5) (А/mallard/Dagestan/004/2018) (1:32 ГА), вируса гриппа В (В/С. Петербург/НИИГ-183/2020) вируса гриппа С (С/Taylor/1233/1947, вируса гриппа А (H5N8) (А/common tern/Uvs-Nuur/26/2016), вируса гриппа А (H5N1) (А/black-headed gull/Sykyvkar/RII-24M/2023) из коллекции ФГБУ НИИ гриппа им А.С.Смородинцева а также близкородственных вирусов и бактерий. Диагностические показатели оценивали при анализе разных видов биологического материала, предварительно охарактеризованного как содержащий (n= 54) или не содержащий (n= 72) вирус гриппа субтипа H5.

Основные результаты. Праймеры и зонд для выявления вируса гриппа А субтипа H5 были выбраны в консервативной области гена гемагглютинаина, чтобы исключить ложноотрицательные результаты, для дифференциации генетической клады 2.3.4.4b был выбран второй сет праймеров в области, специфичной только для данной клады.

С помощью разработанных праймеров детектируется РНК вируса гриппа А субтипа H5 различных клад, с дифференциацией клады 2.3.4.4b. Методика представляет собой мультиплексную ОТ-ПЦР систему, детектирующую сигнал накопления флуоресценции ВКО по каналу для флуорофора FAM, сигнал накопления флуоресценции при амплификации целевой РНК вируса гриппа А субтипа H5 — по каналу для флуорофора HEX, а также сигнал накопления флуоресценции при амплификации целевой РНК вируса гриппа А субтипа H5, относящейся к генетической кладе 2.3.4.4b — по каналу для флуорофора ROX. Оптимизация набора реагентов производилась на амплификаторах: Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США), ДТпрайм («ДНК-технология», Россия).

Было показано отсутствие перекрестных реакций с генетическим материалом других вирусов, а также бактерий, а для праймеров специфичных к кладе 2.3.4.4b отсутствие реакции с РНК вирусом гриппа других генотипов. Аналитическая чувствительность была измерена на разных видах биологического материала и составила 1x10³ ГЭ/мл.

Было проведено тестирование на 54 образцах, предварительно охарактеризованных как содержащие вирус гриппа А субтипа H5 (в том числе 50 образцов, принадлежащих кладе 2.3.4.4b), а также 72 образцах, предварительно охарактеризованных как не содержащие вирус гриппа А субтипа H5. С помощью разработанной методики были получены валидные результаты для всех 126 образцов, дискордантных вариантов не было выявлено.

Выводы. Разработана методика для качественного определения РНК вируса гриппа А субтипа H5 с выявлением по отдельному каналу высокопатогенной генетической клады 2.3.4.4b в биологическом материале птиц методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПЦР С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ С ЦЕЛЮ АМПЛИФИКАЦИИ МАРКЕРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОМА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Чернышев Р.С., Сидоренкова М.С., Садчикова А.С., Иголкин А.С., Мазлум А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

Введение. Одним из важнейших инструментов исследования вируса АЧС является молекулярно-генетический анализ, основанный на секвенировании определенных маркерных областей генома, состоящего из 170-193 т.п.н. и содержащего 150-189 открытых рамок считывания (ОРС). В мире определены 24 генотипа вируса АЧС на основе анализа нуклеотидной последовательности длиной 475 п.н. С-конца гена B646L, кодирующего капсидный белок vp72.

В связи с преобладанием II генотипа вируса АЧС в Евразии и выявлением различных субтипов среди циркулирующих изолятов, Gallardo C. et al., 2023 и Mazloum A. et al., 2023 рекомендован метод субгенотипирования с исполь-

зованием нескольких локусов, позволяющий выделить 25 генетических кластеров внутри генотипа II на основе различных геномных маркеров. В недавнем обзоре было выделено шесть основных (B646L, CVR гена B602L, межгенные области I73R/I329L и MGF 505 9R/10R, K145R и O174L) и семь дополнительных (межгенные области A179L/A137R и C315R/C147L, I267L, MGF 505 5R, MGF 110 7L, MGF 505 9R, MGF 360 10L) генетических маркеров изменчивости, которые и были рекомендованы для характеристики изолятов вируса АЧС II генотипа. С целью проведения филогенетического анализа и молекулярно-эпизоотологической кластеризации новых изолятов вируса АЧС необходимо разработать протоколы амплификации маркерных после-

довательностей генома для последующего секвенирования по Сэнгеру. Классическим методом в таких случаях является проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

го фрагмента представлены в таблице.

В процессе оптимизации условий реакции определены температурно-временной профиль и коли-

Наименование праймера	Нуклеотидная последовательность (5'– 3')	Оптимальная температура отжига, °С	Длина фрагмента, п.н.
B646L Forward	GGC-ACA-AGT-TCG-GAC-ATG-T	50-60	478
B646L Reverse	GTA-CTG-TAA-CGC-AGC-ACA-G		
I267L Forward	TTG-GAC-AAA-TTG-CGT-TGC-GA	50-57	337
I267L Reverse	AAA-TGC-GAC-CGT-CCA-GAA-CT		
K145R Forward	GCA-GCT-TTA-CCG-CAG-CAT-AC	50-62	501
K145R Reverse	AAG-AGT-AGG-TGG-GCG-CTT-TC		
O174L Forward	TGG-CTC-AGA-CGA-TAT-TTC-AA-CTC	52-62	673
O174L Reverse	GCC-TCC-ACC-ACT-TGA-ACC-AT		
CVR Forward	AAG-CTC-ATT-AGG-CAC-ATT-TAA-TGT-TTT-TT-GC	50-61	459
CVR Reverse	CTG-CAG-GAA-TGG-ATG-CCT-TC		
MGF 505 5R Forward	TAC-GCT-TCT-TTT-CAA-TCA-TCA-T	52-57	641
MGF 505 5R Reverse	AAA-TTA-ACA-GTT-GTT-TGC-CTT-C		
IGR I73R/I329L Forward	CCATTATCCCCCGCTTTGG	53-62	356
IGR I73R/I329L Reverse	TCGTCATCCTGAGACAGCAG		
MGF 505 9R/10R Forward	AGA-AAC-CGC-AGA-TGA-ATG-TA	52-60	552
MGF 505 9R/10R Reverse	TAC-AGC-CCT-AGT-TGT-TGA-AG		

электрофоретической детекцией и последующей экстракцией целевых нуклеотидных участков из агарозного геля.

Цель и задачи — дизайн праймеров, оптимизация состава, концентрации компонентов ПЦР-смеси и температурно-временного профиля ПЦР для амплификации маркерных фрагментов генома вируса АЧС (B646L, I267L, K145R, O174L, MGF 505 5R, IGR I73R/I329L, MGF 505 9R/10R), секвенирования, молекулярно- и филогенетического анализов, географической группировки и пространственно-временного исследования.

Материалы и методы. Дизайн праймеров выполнен, исходя из литературных данных, и с помощью NCBI-primer design tool на основе полногеномной последовательности штамма Georgia 2007/1 (FR682468.2). В качестве матрицы для ПЦР использовали геномную ДНК референс-штамма Arm 07 вируса АЧС II генотипа. Выделение ДНК из культуральной суспензии вирусосодержащего материала осуществляли методом нуклеосорбции с использованием набора «ДНК-сорб В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Реакционная ПЦР-смесь содержала компоненты от производителя Thermo Fisher Scientific (Литва). Синтез олигонуклеотидов выполнялся ООО «Синтол» (Россия). ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе Mastercycler Gradient (Eppendorf, Германия). Продукты реакции анализировали с помощью горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия при силе тока 50 мА и напряжении 100 В при экспозиции 40 минут.

Результаты. Наименование и олигонуклеотидная последовательность праймеров, длина амплифицируемо-

ственный состав ПЦР-смеси. Реакционная смесь с итоговым объемом 20 мкл содержала 2 мкл 10× DreamTaq-буфера, 0,5 мкл 25 mM-раствора MgCl₂, 1 мкл 10 mM-раствора каждого dNTP, 1 мкл (10 пмоль) прямого (forward) и 1 мкл (10 пмоль) обратного (reverse) праймеров, 0,2 мкл DreamTaq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл), 9,5 мкл воды свободной от нуклеаз и 5 мкл ДНК-матрицы. Программа амплификации включала в себя этапы общей денатурации 98°С 5 минут, 35 циклов собственно ПЦР (денатурация 98°С 45 секунд, отжиг праймеров 55°С 30 секунд, элонгация 72°С 60 секунд) и дополнительную элонгацию 72°С 5 минут. Оптимальная температура отжига праймеров, определенная в градиенте на амплификаторе Mastercycler Gradient, представлена в таблице. Поскольку для всех фрагментов подходящей температурой отжига являлась 55°С, она была признана универсальной для проведения ПЦР на все экспериментальные маркерные участки генома вируса АЧС.

Заключение. В связи с регулярной нотификацией вспышек АЧС на территории Российской Федерации назревает необходимость проведения референтных научных исследований, направленных на субгенотипирование изолятов внутри II генотипа, с целью изучения молекулярной эволюции и циркуляции различных генетических групп данного возбудителя. Разработанный протокол ПЦР с электрофоретической детекцией дает возможность амплифицировать маркерные области генома вируса АЧС для их последующего секвенирования, филогенетического анализа и географической кластеризации.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ МОЛОКА КОРОВ БОЛЬНЫХ МАСТИТОМ МЕТОДОМ NGS

Буракова И.Ю.¹, Смирнова Ю.Д.^{1,2}, Грязнова М.В.^{1,2}, Морозова П.Д.^{1,2}, Сыромятников М.Ю.^{1,2,3}

¹ Воронежский государственный университет инженерных технологий (ФГБОУ ВО «ВГУИТ»), Воронеж, Россия

² Воронежский государственный университет (ФГБОУ ВО «ВГУ»), Воронеж, Россия

³ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии (ФГБНУ «ВНИВИПФит»), Воронеж, Россия

Актуальность. Мастит является одной из основных проблем молочного животноводства, в первую очередь у крупного рогатого скота (КРС). По симптоматике маститы можно разделить на клинические и субклинические. Клинический мастит имеет ярко выраженные симптомы — покраснение воспаленного участка, местное повышение температуры, общий озноб, боли в области поражения. Основными причинами являются бактериальные возбудители: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Субклинический мастит не столь опасен для жизни КРС, но встречается гораздо чаще. Его вызывают грамотрицательные бактерии, такие как *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Serratia marcescens*. Бактерии, выделенные из маститного молока, часто обладают устойчивостью к антибиотикам, что может затруднять процесс лечения КРС. Это исследование позволяет лучше оценить роль микробиома молока при мастите КРС, а также скорректировать дальнейшие исследования для сбора информации и разработки эффективного лечения мастита.

Цель. Целью исследования является изучение микробиома в образцах молока КРС с клиническими и субклиническими проявлениями мастита, а также здорового КРС путем секвенирования гена 16S рРНК (гипервариабельный регион V3) на платформе Ion Torrent PGM.

Методы. Для исследования было отобрано 15 коров с различной патологией вымени. От всех исследуемых животных в начале и в конце эксперимента брали пробы цельного молока.

Для выделения ДНК из полученных образцов молока использовали коммерческий набор HiPure DNA Micro Kit (Magen, Китай). Для реакции ПЦП-анализ гипервариабельной области V3 гена 16SpРНК использовали пару универсальных праймеров: 337F: 5'-GACTCCTACGGGAGGCWGCAG-3'; 518R: 5'-GTATTACCGCGCCTGCTGG-3'.

Для создания библиотек использовался коммерческий набор NEXTFlex Kit (Массачусетс, США). Для секвенирования библиотеки загружали в Ion 318™ Chip v2 BC с использованием стандартных протоколов набора Ion PGM Hi-Q View OT2. Статистическую обработку извлеченных данных проводили с помощью языка программирования R в среде R Studio. Идентификация проводилась с использованием базы данных SILVA. Дифференциальный анализ численности осуществляли с использованием DESeq2. В DESeq2 значения p, полученных на основе результатов теста Вальда при попарном тестировании.

Основные результаты. В результате секвенирования выявлен пул бактерий, относительное количество которых изменяется при субклиническом и клиническом мастите. Наблюдалось преобладание рода *Streptococcus*

у коров с клиническим маститом и в группе здоровых коров (28% и 32% соответственно). У коров с субклиническим маститом преобладал род *Staphylococcus*, численность которого составила 29%. *Staphylococcus* был вторым по распространенности родом в группе коров с клиническим маститом и в группе здоровых коров. В обеих группах после лечения антибиотиками наблюдалось доминирование рода *Cutibacterium*. Его обилие для группы с катаральным маститом после лечения составило 13%, а для группы с субклиническим маститом 10%.

Сравнительный анализ состава микробиома при клиническом мастите показал наличие статистически значимых различий по сравнению со здоровой группой. Так, в молоке, полученном от коров, больных маститом, увеличилось количество представителей родов *Hymenobacter* и группы *Lachnospiraceae* NK4A136. В то же время при клиническом мастите количество *Corynebacterium*, *Atopostipes*, *Lachnospiraceae* NK3A20 group, *Weissella*, *Bosea* и *Ralstonia* уменьшились. При сравнении микробиома группы субклинического мастита со здоровой группой было обнаружено увеличение *Hymenobacter*, *Massilia* и *Methylobacterium-Methylorubrum*. При этом численность *Lachnospiraceae* NK3A20, *Caulobacter*, *Streptococcus* и *Ralstonia* уменьшилась.

При анализе различий между двумя формами мастита установлено, что для субклинического мастита характерно повышенное содержание рода *Streptococcus* по сравнению с клинической формой мастита.

Для наблюдения за восстановлением микробиоты после антибактериальной терапии, эти группы сравнивали со здоровым контролем. Дифференциальный анализ различий показал, что после антибиотикотерапии в группе с субклиническим маститом количество *Asticccaaulis*, *Rikenellaceae* dgA-11, *Chryseobacterium*, *Facklamia* увеличивалось в молоке по сравнению со здоровой группой. В то же время наблюдалось снижение количества *Staphylococcus*, *Caulobacter*, и *Ralstonia*.

Выводы. Согласно полученным результатам, несколько таксонов могут быть связаны с развитием субклинического и клинического мастита. К ним относятся *Hymenobacter*, *Ralstonia*, *Lachnospiraceae* NK4A136 и *Atopostipes*. Бактерии, претерпевающие значительные количественные изменения, могут служить индикаторами субклинического или клинического мастита. Так же было показано, что антибиотики действительно снижали уровень *Streptococcus* по сравнению со здоровой группой и коровами до лечения антибиотиками. Кроме того, антибиотикотерапия способствовала увеличению численности полезных бактерий рода *Asticccaaulis*. Таким образом, наше исследование выявило потенциальную связь между микробиомом молока и развитием мастита

MOLECULAR EVIDENCE OF BABESIA OVATA IN CATTLE IN RUSSIA

Alexeenkova S.V., Zhuravleva E. A., Malceva O. E., Loschinin M. N.

Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (FSC VIEV) Moscow, Russia

Introduction. *Babesia ovata* (*B.ovata*) is a protozoan parasite in cattle. It is localized inside red blood cells and transmitted by ixodid ticks of genus *Haemaphysalis longicornis*. *B. ovata* was first found in Japan. *B. ovata* has moderate pathogenicity compared to *B. bovis* and *B. bigemina*. However, previous articles described the clinical effects of *B. ovata* in calves. Their immune systems were compromised by splenectomy. Those animals were infected with another parasite — *Theileria orientalis*. The disease's effects have been understood poorly [2]. In Russia, the spread of *B. ovata* in cattle has not been previously researched. Until recently, the only available method for examining protozoans was light microscopy. However, the quantity of *B. ovata* in infected cattle is usually very low and diagnosis is difficult. Morphology is similar among many of the large parasites of *Babesia* species and light microscopy is not an effective diagnostic method for species differentiation.

The purpose of the work. Research into epizootic state on viral and protozoan diseases in farm animals in the Russian Federation.

Materials and methods. The study was carried out using virological, serological and molecular genetic methods. Herpesvirus type 4 was isolated in lungs of deceased cattle on a cell culture of bovine embryonic lung and kidney. A virus neutralization test was performed to detect antibodies. DNA extraction from blood and tissues was performed with M-sorb kit (Synthol, Russia). Preparation of DNA- fragment library and whole-genome sequencing on the SOLiD 4 platform (Life Technologies, Foster City, CA, USA) were carried out in accordance with the manufacturer's instructions using the following kits: SOLiD Fragment Library Construction Kit, SOLiD Fragment Library Barcoding Module 1–16, SOLiD EZ Bead TM E80 System Consumables and SOLiD ToP Sequencing Kit, MM50/5. Sequence data analysis was done with software Kraken 2.0, Blast (NCBI), ORF finder (SMS). Statistical analysis of the representation of taxa in the samples, we used Fit Feature Model of the R language metagenomeSeq package [1]. Correcting p values for multiple comparisons was carried out using the Benjamini-Hochberg method; differences were calculated statistically significant at $p < 0.05$ after correction.

Main results. In 2018–2022 in the Tver region of the Russian Federation, a mass collection of samples of clinical and patho-

logical material was carried out under a program for monitoring the epizootic situation among farm animals. The results of our study came from a metagenomics analysis on the Illumina/Solexa platform. It revealed that the *B. ovata* genome in lung samples from cattle that died from pneumonia was caused by bovine gammaherpesvirus type 4.

This is the first report of discovery *B. ovata* on the territory of the Russian Federation. The genome fragment was registered in the NCBI nucleotide sequence database BankIt2738985 *Babesia* OR501883. Ticks *Haemaphysalis longicornis*, which are carriers of *B. ovata* are distributed in the Russian Far East, northeastern China, northern islands of Japan, Korea, Fiji, New Zealand and Australia [3]. It should be noted that samples from cattle we collected on the territory of the Tver region, which are not included in the habitat of the carriers. It is known that cattle are historically located in this region and have no history of contact with animals brought from the geographical distribution of the pathogen. In the future, we plan to isolate and characterize the Russian population of *B. ovata* in order to determine its pathogenicity. In addition, the identification of tick vectors capable of transmitting *B. ovata* to cattle is important, as infestation control methods must also include a tick control strategy.

Conclusion. On the territory of the Russian Federation, the spread of babesiosis in cattle caused by *B. Ovata* was discovered for the first time. Sampling was carried out in the Tver region, which is not part of the habitat of *Haemaphysalis longicornis*. The mechanism of transmission remains unclear and requires further research.

References.

1. Paulson J. N. et al. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys // *Nature methods*. 2013. Vol. 10, No. 12. P. 1200—1202.
2. Sivakumar T, Tagawa M, Yoshinari T, Ybañez AP, Igarashi I, Ikehara Y, Hata H, Kondo S, Matsumoto K, Inokuma H, Yokoyama N. PCR detection of *Babesia ovata* from cattle reared in Japan and clinical significance of coinfection with *Theileria orientalis*. *J Clin Microbiol*. 2012 Jun;50(6):2111-3. doi: 10.1128/JCM.00220-12. Epub 2012 Mar 21. PMID: 22442312; PMCID: PMC3372144.
3. Sivakumar T, Igarashi I, Yokoyama N. *Babesia ovata*: Taxonomy, phylogeny and epidemiology. *Vet Parasitol*. 2016;229:99-106. doi:10.1016/j.vetpar.2016.10.006

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСТОПородНОСТИ НА ОСНОВании АНАЛИЗА SNP для свиНей ПОРОды БЕЛОРУССКАЯ КРУПНАЯ БЕЛАЯ

Снытков Е.В., Кипень В.Н., Михайлова М.Е., Шейко Р.И.

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Введение. Среди разводимых в Республике Беларусь плановых пород свиной белорусская крупная белая порода доминирует по численности, на ее долю приходится не ме-

нее 90% маток и 60% хряков [1]. Материалом для создания белорусской крупной белой породы являлись чистопородные заводские стада свиной внутрипородного типа бело-

русской популяции крупной белой породы (1975). В ходе секционного процесса была создана белорусская крупная белая порода, патент на которую был зарегистрирован 28.11.2007 г. Данная порода характеризуется высокой резистентностью, откормочной и мясной продуктивностью, материнскими качествами [2]. Перед селекционерами часто встает вопрос о чистопородности тот или иной особи, особенно при использовании ее селекционных мероприятий.

Цель и задачи. В этой связи, цель настоящего исследования — охарактеризовать SNP (Single Nucleotide Polymorphism) с высоким дифференцирующим потенциалом для определения чистопородности особей свиней белорусской крупной белой породы.

Материалы и методы. В биоинформатическом анализе были задействованы 248 особей вида *Sus scrofa domesticus* (дюрок — 85, ландрас — 46, крупная белая — 70, пьетрен — 28, йоркшир — 19), «сырые» данные полных геномов которых расположены в базе SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>): PRJEB1683, PRJNA260763, PRJNA255085, PRJEB9922, PRJNA309108, PRJNA322309, PRJNA358108, PRJNA343658, PRJNA378496, PRJNA393920, PRJNA487172, PRJNA506339, PRJNA507853, PRJNA485589, PRJNA488960, PRJEB30282, PRJNA520978, PRJNA550237, PRJNA553106, PRJNA622908,

PRJNA626370, PRJNA671763, PRJNA712489. Для биоинформатического анализа были использованы геномы животных, представленные в открытом доступе в формате SRA (Sequence Read Archive), которые дополнительно конвертировали в формат *.fasta с использованием пакета SRA-Toolkit v.2.11. Для автоматизации процесса поиска нуклеотидных последовательностей *in silico*, фланкирующих искомым аллель, использовали программу GenS, написанную на языке программирования Python v.3.10, в среде разработки программного обеспечения Jupyter Notebook.

Биологическим материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы ДНК 142 домашних свиней пяти пород, разводимых в Республике Беларусь (дюрок — ДЮ, ландрас — ЛА, йоркшир — ЙО, белорусская крупная белая — БКБ, белорусская мясная — БМ). Рассчитаны частоты распространенности генотипов и аллелей. Дифференцирующий потенциал SNP определяли с использованием ROC-анализа в SPSS v.20.0.

Основные результаты. Результаты ROC-анализа для SNP AX-116690009 (целевая порода по данным биоинформатического анализа, проведенного в 2022 г [3]. — дюрок), AX-116346555 (дюрок), AX-116519407 (дюрок), AX-116735790 (крупная белая), AX-116218162 (крупная белая), AX-116298633 (ландрас), AX-116379068 (ландрас) представлены в таблице.

ТАБЛИЦА. ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ SNP ДЛЯ СВИНЕЙ ПОРОДЫ БЕЛОРУССКАЯ КРУПНАЯ БЕЛАЯ, БКБ (НА ОСНОВАНИИ ROC-АНАЛИЗА ПО ДАННЫМ KASP

SNP	AUC	p-уровень	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница
AX-116690009	0,541	0,366	0,455	0,627
AX-116346555	0,427	0,105	0,344	0,510
AX-116519407	0,452	0,286	0,369	0,535
AX-116735790	0,270	<0,0001	0,205	0,336
AX-116218162	0,773	<0,0001	0,699	0,846
AX-116298633	0,749	<0,0001	0,673	0,824
AX-116379068	0,698	<0,0001	0,621	0,776

На основании результатов, представленных в таблице, наибольшим дифференцирующим потенциалом (как за счет подтверждающих аллелей, т.е. специфичных для БКБ, так и за счет исключающих аллелей, т.е. специфичных для других пород в исследовании) для различения белорусской крупной белой [БКБ] от других пород, а именно: ландрас [ЛА], дюрок [ДЮ], белорусская мясная [БМ] или йоркшир [ЙО], — оказались SNP AX-116735790, AX-116218162, AX-116298633 и AX-116379068.

У белорусской крупной белой для SNP AX-116735790 частота аллеля А составила 91,8%, частота аллеля G — 8,2%; AX-116218162 частота аллеля С — 43,9%, частота аллеля G — 56,1%; AX-116298633 частота аллеля А — 40,8%, частота аллеля G — 59,2%; AX-116379068 частота аллеля А — 25,5%, частота аллеля G — 74,5%.

Заключение. Таким образом, на практическом материале впервые в Беларуси показан дифференцирующий потенциал SNP AX-116735790, AX-116218162, AX-116298633 и AX-116379068 для различения биологических образцов, принадлежащим породе БКБ, от других пород свиней. В пер-

спективе планируется расширить исследования в данной области: увеличить выборки и провести совместный анализ нескольких SNP для разработки модели дифференциации.

Исследование выполнено в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма «Геномика, эпигеномика, биоинформатика» на 2021-2025 гг., задание «Разработка системы генетического анализа для определения чистопородности свиней на основе изучения SNP-локусов» (2021-2023 гг.)

Литература:

1. Лобан, Н.А. Крупная белая порода свиней – методы совершенствования и использования / Н.А. Лобан // Минск: ПЧУП Бизнесофсет, 2004. — 110 с.
2. Лобан, Н.А. Достижение белорусских селекционеров / Н.А. Лобан, О.Я. Василюк, А.С. Чернов // Животноводство России. Спецвыпуск «Свиноводство». — 2009. — С. 23–24.
3. Дифференциация пород домашних свиней с использованием расширенного биоинформатического анализа SNP / В. Н. Кипень [и др.] / Доклады Национальной академии наук Беларуси. — 2022. — Т.66. — № 3. — С. 301-309. DOI: 10.29235/1561-8323-2023-67-2-119-125.

ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ SNP ДЛЯ СВИНЕЙ ПОРОДЫ БЕЛОРУССКАЯ МЯСНАЯ

Снытков Е.В., Кипень В.Н., Михайлова М.Е., Шейко Р.И.

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Введение. Белорусская мясная порода является результатом сложного селекционного процесса, в ходе которого было осуществлено скрещивание таких мясных пород как ландрас, пьетрен, эстонская беконная и уэссекс-седлбекская. Данная порода была утверждена в Республике Беларусь приказом Минсельхозпрода № 271 от 18.10.99 г. В настоящий момент данная порода свиней широко используется в системе скрещивания и гибридизации в качестве отцовской формы, обеспечивая таким образом до 2 млн. помесей и гибридов в промышленном свиноводстве с выходом мяса в тушах около 60% [1, 2].

Цель и задачи. Выявить и исследовать SNP с высоким дифференцирующим потенциалом для различения свиней породы белорусская мясная с другими породами, представленными в Беларуси.

Материалы и методы. Для биоинформатического анализа были использованы геномы животных, представленные в открытом доступе в формате SRA (Sequence Read Archive), которые дополнительно конвертировали в формат *.fasta с использованием пакета SRA-Toolkit v.2.11. Для автоматизации процесса поиска нуклеотидных последовательностей *in silico*, фланкирующих искомым аллель, использовали программу GenS, написанную на языке программирования Python v.3.10, в среде разработки программного обеспечения Jupyter Notebook. В биоинформа-

тическом анализе были задействованы 248 особей вида *Sus scrofa domesticus* (дюрок — 85, ландрас — 46, крупная белая — 70, пьетрен — 28, йоркшир — 19), «сырые» данные полных геномов которых расположены в базе SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>): PRJEB1683, PRJNA260763, PRJNA255085, PRJEB9922, PRJNA309108, PRJNA322309, PRJNA358108, PRJNA343658, PRJNA378496, PRJNA393920, PRJNA487172, PRJNA506339, PRJNA507853, PRJNA485589, PRJNA488960, PRJEB30282, PRJNA520978, PRJNA550237, PRJNA553106, PRJNA622908, PRJNA626370, PRJNA671763, PRJNA712489. Биологическим материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы ДНК 142 домашних свиней пяти пород, разводимых в Республике Беларусь (дюрок — ДЮ, ландрас — ЛА, йоркшир — ЙО, белорусская крупная белая — БКБ, белорусская мясная — БМ). Рассчитаны частоты распространенности генотипов и аллелей. Дифференцирующий потенциал SNP определяли с использованием ROC-анализа в SPSS v.20.0.

Основные результаты. Результаты ROC-анализа для SNP AX-116690009 (целевая порода по данным биоинформатического анализа, проведенного в 2022 г [3]. — дюрок), AX-116346555 (дюрок), AX-116519407 (дюрок), AX-116735790 (крупная белая), AX-116218162 (крупная белая), AX-116298633 (ландрас), AX-116379068 (ландрас) представлены в таблице.

ТАБЛИЦА. ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ SNP ДЛЯ СВИНЕЙ ПОРОДЫ БЕЛОРУССКАЯ МЯСНАЯ, БМ (НА ОСНОВАНИИ ROC-АНАЛИЗА ПО ДАННЫМ CASP).

SNP	AUC	p-уровень	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница
AX-116690009	0,441	0,211	0,348	0,534
AX-116346555	0,285	<0,0001	0,211	0,358
AX-116519407	0,453	0,317	0,366	0,539
AX-116735790	0,451	0,298	0,355	0,546
AX-116218162	0,491	0,857	0,404	0,579
AX-116298633	0,465	0,458	0,369	0,561
AX-116379068	0,303	<0,0001	0,227	0,379

На основании результатов, представленных в таблице, наибольшим дифференцирующим потенциалом (как за счет подтверждающих аллелей, т.е. специфичных для БМ, так и за счет исключаящих аллелей, т.е. специфичных для других пород в исследовании) для различения белорусской мясной [БМ] от других пород, а именно: ландрас [ЛА], дюрок [ДЮ], белорусская крупная белая [БКБ] или йоркшир [ЙО], — оказались SNP AX-116346555 и AX-116379068.

У белорусской мясной для SNP:

— AX-116346555 частота аллеля G составила 61,4%,

частота аллеля T — 38,6%;

— AX-116379068 частота аллеля A — 73,9%, частота аллеля G — 26,1%;

Заключение. Таким образом, на практическом материале впервые в Беларуси показан дифференцирующий потенциал SNP AX-116346555 и AX-116379068 для различения биологических образцов, принадлежащих породе БМ, от других пород свиней. В перспективе планируется расширить исследования в данной области: увеличить выборки и провести совместный анализ не-

скольких SNP для разработки модели дифференциации.

Исследование выполнено в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма «Геномика, эпигеномика, биоинформатика» на 2021-2025 гг., задание «Разработка системы генетического анализа для определения чистопородности свиней на основе изучения SNP-локусов» (2021-2023 гг.)

Литература:

1. Шейко, И. П. Свиноводство / И. П. Шейко, В. С. Смирнов. — Минск: «Ураджай», 1997. — 352 с.

2. Федоренкова, Л. А. Селекционно-генетические основы выведения белорусской мясной породы свиней: монография / Л. А. Федоренкова, Р. И. Шейко. — Минск, Белорусское издательское Товарищество «Хата», 2001. — 214 с.

3. Дифференциация пород домашних свиней с использованием расширенного биоинформатического анализа SNP / В. Н. Кипень [и др.] / Доклады Национальной академии наук Беларуси. — 2022. — Т.66. — № 3. — С. 301-309. DOI: 10.29235/1561-8323-2023-67-2-119-125.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛОШАДЕЙ БЕЛОРУССКОЙ УПРЯЖНОЙ ПОРОДЫ, РАЗВОДИМОЙ НА ПЛЕМЕННОМ КОННОМ ЗАВОДЕ «ЖОДИНОАГРО-ПЛЕМЭЛИТА»

Долматович Т.В.¹, Сазанович Н.С.², Шейко Р.И.¹

¹ Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь.

² Республиканское дочернее унитарное предприятие по племенному делу «ЖодиноАгроПлемЭлита», агрогородок Барсуки, Республика Беларусь

Введение. На сегодняшний день в базе данных GenBank представлено 425 полных митохондриальных геномов лошадей различных пород. В тоже время анализ генетического разнообразия митохондриальной ДНК и исследование филогенетических отношений между современными породами и древними лошадьми у белорусской упряжной породы до настоящего момента не проводились.

Цель и задачи. Охарактеризовать генетическое разнообразие лошадей белорусской упряжной породы, разводимых на племенном конном заводе «ЖодиноАгроПлемЭлита» на основе полиморфизма митохондриальной ДНК.

Материалы и методы. Материалом для исследований служили образцы волосных луковиц из гривы лошадей белорусской упряжной породы, полученные из племенного конного завода «ЖодиноАгроПлемЭлита». Конеполовье хозяйства состоит из 125 голов, из которых 39 ко-нематок, 8 жеребцов. Остальное молодняк разных возрастов и рабочие лошади. Секвенирование последовательностей генов цитохром с-оксидаз COX1, COX2 и COX3 и прилегающих участков мтДНК проводили с использованием 7 пар перекрывающихся праймеров, разработанных с учетом рефе-

ренсной последовательности ископаемой шведской лошади X79547. Для идентификации полученных секвенированных последовательностей использовали данные GeneBank, размещенные под номером доступа: JN398377-JN398457, EF597513—EF597514. Анализ данных проводили согласно классификации Achilli с соавт. Для реконструкции филогенетических деревьев использовали Байесовский метод (программа BEAST).

Основные результаты. Методом секвенирования по Сэнгеру определены последовательности генов цитохром с-оксидаз: COX1, COX2, COX3 и прилегающих участков митохондриального генома, включая гены: ATPase8, ATPase6 у 76 образцов лошадей белорусской упряжной породы. В результате, размер консенсусной последовательности мтДНК изученных лошадей составил 4550 п.н. и локализован в пределах 5050 — 9600 п.н. согласно нумерации нуклеотидов полного митохондриального генома Equus caballus. Картирование консенсусных фрагментов на референсный геном Equus caballus X79547.1 позволило идентифицировать 81 полиморфный нуклеотидный сайт (таблица), из которых 46 оказались филогенетически информативными.

ТАБЛИЦА. ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ЗАМЕНЫ, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ У БЕЛОРУССКОЙ УПРЯЖНОЙ ПОРОДЫ ЛОШАДЕЙ, РАЗВОДИМОЙ НА ПЛЕМЕННОМ КОННОМ ЗАВОДЕ «ЖОДИНОАГРОПЛЕМЭЛИТА»

Название гена	Координаты гена	Однонуклеотидные замены/делеции
tRNA-Ala	5051 — 5119	5061G>A
tRNA-Asn	5121 — 5193	5098T>A
origin of L strand replication	5194 — 5225	5210delG
tRNA-Cys	5226 — 5293	5238delA, 5276delA
tRNA-Tyr	5294 — 5360	—

COX1	5362 — 6906	5418C>T, 5457C>T, 5500C>T, 5529C>T, 5640T>C, 5671T>C, 5817A>G, 5829C>T, 5832G>A, 5883A>G, 5886C>T, 5931T>C, 6006G>A, 6093T>C, 6177T>C, 6177T>A, 6249G>A, 6300T>C, 6309T>C, 6414A>G, 6507T>C, 6531G>A, 6600C>T, 6690T>C, 6714T>C, 6726C>T, 6786G>A,
tRNA-Ser	6904 — 6972	6932A>G, 6949T>C
tRNA-Asp	6981 — 7047	7003G>A
COX2	7048 — 7731	7245G>A, 7249T>C, 7429C>T, 7449T>C, 7479C>T, 7518A>G, 7575T>C, 7578G>A, 7614A>T, 7629T>C, 7726T>C
tRNA-Lys	7735 — 7802	7668A>G
ATP8	7804 — 8007	7900T>C, 7902T>C, 7914A>G, 7983G>A
ATP6	7965 — 8645	8007G>A, 8039A>G, 8045C>T, 8060C>T, 8078C>T, 8152G>A, 8174T>C, 8240T>C, 8303A>G, 8321C>T, 8306C>T, 8354T>C, 8360G>A, 8363G>A, 8381C>T, 8492G>A, 8504C>T, 8558A>T, 8567C>T
COX3	8645 — 9427	8794C>T, 8857C>T, 9055C>T, 9088C>T, 9241A>G, 9304A>T, 9333G>A, 9403C>T, 9404G>A
tRNA-Gly	9429 — 9497	9458C>T
ND3	9498 — 9842	9620T>C

Перечень идентифицированных мутаций и филогенетический анализ в программе BEAST определили принадлежность 76 изученных образцов лошадей к семи гаплогруппам: B, E, G, I, L, P, R.

Заключение. Присутствие семи гаплогрупп, удаленных друг от друга позволяет сделать вывод о высоком уровне генетического разнообразия материнских линий лошадей белорусской упряжной породы, разводимых в племенном конном заводе «ЖодиноАгроПлемЭлита». В то же время, полученные данные для ограниченного количества особей, могут не являются репрезентативными для всей породы

лошадей, разводимой на племенных конфермах Республики Беларусь.

Исследование выполнено в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма «Геномика, эпи-геномика, биоинформатика» на 2021-2025 гг., задание «Изучение генетического разнообразия аборигенных популяций лошадей Беларуси с помощью молекулярных методов» (2021-2023 гг.)

Литература: Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that under-went domestication // A. Achilli [et al.]. — Proc. Natl. Acad. Sci. — 2012. — Vol.109, № 17. — P. 2449 — 2454. doi.org/10.1073/pnas.1111637109.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ВЭЖХ-МС/МС МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ЛИДОКАИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТА 2,6-ДИМЕТИЛАНИЛИНА В ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Гончарова Е.Н.¹, Комаров А.А.^{1,2}, Габидуллина Д.Э.¹

¹ Биоаналитическая лаборатория ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия.

² ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ», Москва, Россия.

Введение. Лидокаин обладает местноанестезирующим действием, препятствует генерации импульсов в окончаниях чувствительных нервов и проведению импульсов по нервным волокнам, что сводит до минимума риск возникновения болевых ощущений при парентеральном введении препарата. В организме животных лидокаин подвергается метаболизму, в результате чего в тканях формируется ряд метаболитов, наибольший интерес из которых представляет 2,6-диметиланилин (2,6-ДМА), поскольку, по оценке Международного агентства по изучению рака IARC это вещество является потенциальным канцерогеном и является основным метаболитом

лидокаина у КРС. 2,6-диметиланилин — метаболит лидокаина, который имеет мутагенные и генотоксичные свойства, в организме человека и животных может гидроксилироваться до 4-амино-3,5-диметиленола, который в виде конъюгата в моче обнаруживается в 80% от дозы лидокаина, введенной человеку или животному. Данный продукт метаболизма имеет генотоксичные свойства. Также 2,6-ДМА может приводить к образованию N-(2,6-диметилфенил)-гидроксиламин, который может взаимодействовать с ДНК пациента.

2,6-ДМА является низкомолекулярным липофильным соединением, за счет присутствия одного бензольного

кольца в структуре с присутствием метильных радикалов и небольшой по сравнению с самой молекулой функциональной группой $-NH_2$. Азот, присутствующий в молекуле 2,6-ДМА, имеет одну неподеленную пару электронов и в растворах может присоединять к себе H^+ . В таком варианте данное соединение может проявлять различные свойства, как липофильные, так и гидрофильные. В литературе встречаются методики определения 2,6-ДМА в различных биологических матрицах, в том числе с использованием в качестве очитки проб твердо-фазной экстракции (ТФЭ). Однако в литературе сообщается, что использование ТФЭ может приводить к существенным потерям 2,6-ДМА.

Цель и задачи. Целью данной работы являлась разработка методики одновременного определения лидокаина и его метаболита 2,6-ДМА в продукции животного происхождения. В задачи работы входили: подбор и оптимизация условий экстракции аналитов и дериватизации, которые позволили бы надежно определять лидокаин и 2,6-ДМА.

Материалы и методы. В работе для определения использовали жидкостной хроматограф Sciex Exion LC с трехквadrupольным масс-спектрометром «5500 QTRAP» (AB SCIEX, Канада). Разделение проводили с использованием хроматографической колонки ZORBAX Eclipse Plus C18 2,1 x 50 мм, 5 мкм. (Agilent Technologies, США). В качестве подвижных фаз использовали 0,5% муравьиюю кислоту в воде или в метаноле.

Результаты. При разработке ВЭЖХ-МС/МС анализа 2,6-ДМА было выяснено, что данный аналит дает несколько MRM-переходов, однако все они имеют высокий уровень фонового сигнала. При этом сам аналит несмотря на его липофильность плохо удерживается на таких сорбентах как C18, а пик широкий и не симметричный. Поэтому нами была предложена схема с дериватизацией: к навеске мышечной ткани и органов вносили внутренний стандарт 2,6-ДМА-Д9 и проводили экстракцию дихлорметаном. К экстракту добавляли триэтиламин и ацетилхлорид и проводили дериватизацию в течение 1 ч при перемешивании. По окончании дериватизации для удаления триэтиламина

и избытка ацетилхлорида добавляли деионизованную воду, после чего органический слой упаривали в токе азота досуха. Сухой остаток перерастворяли в ацетонитриле, фильтровали и использовали для ВЭЖХ-МС/МС анализа. При анализе жировой ткани первичную экстракцию проводили ацетонитрилом, для удаления жиров в экстракт вносили концентрированную серную кислоту, после чего проводили нейтрализацию серной кислоты гидроксидом натрия и проводили повторную жидкость-жидкостную экстракцию дихлорметаном. После чего проводили дериватизацию ацетилхлоридом в присутствии триэтиламина как и в случае с другими матрицами.

Дериватизация позволяет увеличить молекулярную массу детектируемого соединения и его иона-прекурсора: 2,6-ДМА имеет молекулярную массу, равную +121,2 г/моль, а его ион-прекурсор имеет m/z , равный +122,3, в то время, как конечный дериват имеет молекулярную массу, равную +163,0 г/моль, а m/z равен +163,9. Увеличение массы детектируемого соединения положительно влияет на его определение с помощью масс-спектрометрии. При этом наиболее интенсивный MRM-переход (163,9 → 122,1) имеет невысокий фон. Дериват значительно сильнее удерживается на обращенно-фазном сорбенте, что позволяет надежнее его детектировать. Условия реакции были подобраны таким образом, чтобы обеспечить полную дериватизацию 2,6-ДМА в 2,6-диметиланилид уксусной кислоты. Аналогичным образом в ходе пробоподготовки дериватизации подвергается и внутренний стандарт 2,6-диметиланилин-Д9, с получением 2,6-диметиланилида-Д9 уксусной кислоты. Важно отметить, что в условиях дериватизации сам лидокаин извлекается количественно, но не подвергается трансформации.

Заключение. Разработана методика определения лидокаина и 2,6-ДМА в таких матрицах как мясо, жир, печень, почки и легкие. Для каждой матрицы была проведена валидация разработанной методики в соответствии с требованиями Veterinary International Conference on Harmonization. Статистические параметры приведены в табл. 1.

ТАБЛИЦА 1. СТАТИСТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИДОКАИНА И 2,6-ДМА.

Аналит	Аналитический диапазон, нг/г	Правильность*, %	%CV*
Лидокаин	0,2-20	От -11 до 8	3-8
2,6-ДМА	5-200	От -7 до 6	3-10

* варьируются в зависимости от матрицы и концентрации аналита в образце.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОСПЫ ВЕРБЛЮДОВ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Сейсенбаева М.С., Кошематов Ж.К., Оразымбетова Н.К., Умуралиев Б.К.

РГП «НИИ проблем биологической безопасности» МЗ РК Республики Казахстан, пгт Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область, ribsp@biosafety.kz

Введение. Вирус оспы верблюдов принадлежит к роду ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*) подсемейства хор-

допоксвирусов (*Chordopoxvirinae*) семейства поксвирусов (*Poxviridae*). Характерными симптомами болезни являются

лихорадка, локальные или общие поражения в виде оспенной сыпи на коже и на слизистых оболочках рта и дыхательных путей. Оспа верблюдов встречается практически во всех странах, в которых практикуется верблюдоводство. Вспышки болезни отмечались на Ближнем Востоке (Бахрейн, Иран, Ирак, Оман, Саудовская Аравия, Объединенные Арабские Эмираты и Йемен), в Азии, в Африке, России, Индии и в Казахстане. Периодичность возникновения оспы верблюдов указывает на необходимость разработки диагностических препаратов нового поколения. Который даёт возможность провести диагностические исследования своевременно и за короткий срок.

Целью нашей работы являлось приготовление одним из основного диагностического препарата конъюгата для диагностики оспы верблюдов с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

Задачи. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: получить специфические сыворотки на

разных видах животных; выделить иммуноглобулины из специфических сывороток; приготовить конъюгат и проверить их активность.

Методы. В ходе работы были получены специфические сыворотки против вируса оспы верблюдов на овцах и кроликах, их активность в реакции диффузионной преципитации (РДП) составила 1:8-1:16 соответственно. Из специфических сывороток были выделены иммуноглобулины двумя методами. Активность выделенных гамма-глобулинов проверяли в РДП, результаты представлены в таблице.

По данным таблицы видно, что выделенные иммуноглобулины у овцы и кролика по спиртовому методу Кона в РДП показали активность 1:8 — 1:16, соответственно. Однако активность овечьего иммуноглобулина выделенные сернокислым аммонием к вирусу оспы верблюдов в РДП оказались на один порядок активнее — 1:16, чем иммуноглобулин, выделенный по методу Кона.

ТАБЛИЦА. ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ, А ТАКЖЕ КОНЦЕНТРАЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Животные	Методы	Активность в РДП	Концентрация белка мг/мл
Овца	спиртовой метод Кона	1:8	1,67
	сернокислый аммония	1:16	1,34
Кролик	спиртовой метод Кона	1:16	0,96
	сернокислый аммония	1:8	0,61

Основные результаты. На основе глобулинов были приготовлены иммунопероксидазные конъюгаты по методу Уилсон и Накане. Предельной активностью специфических конъюгатов в ИФА составили 1:800 соответственно, рабочей дозой специфического препарата в

ИФА является их восьмикратное разведение 1:100 соответственно.

Выводы. На практике приготовленные иммунопероксидазные конъюгаты будут использоваться для постановки диагноза оспы верблюдов.

DIAGNOSTIC DRUG FOR THE DIAGNOSIS OF CAMEL POX USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Seisenbayeva M.S., Koshemetov Zh.K., Orazymbetova N.K., Umuraliev B.K.

RSE «Research Institute for Biological Safety Problems» of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, Gvardeysky, Korday district, Zhambyl region, ribsp@biosafety.kz

Introduction. The camel pox virus belongs to the genus Orthopoxvirus of the chordopoxvirus subfamily of the Poxviridae family. Characteristic symptoms of the disease are fever, local or general lesions in the form of smallpox rash on the skin and on the mucous membranes of the mouth and respiratory tract. Camel pox is found in almost all countries in which camel breeding is practiced. Outbreaks have occurred in the Middle East (Bahrain, Iran, Iraq, Oman, Saudi Arabia, the United Arab Emirates and Yemen), Asia (Afghanistan and Pakistan), Africa (Algeria, Egypt, Ethiopia, Kenya, Mauritania, Morocco, Niger, Somalia and Sudan), Russia, India, including the Republic of Kazakhstan.

The frequency of occurrence of camel pox indicates the need to develop a new generation of diagnostic drugs, which makes it possible to conduct diagnostic tests in a timely manner and in a short time.

The aim of our work was to prepare one of the main diagnostic preparations of conjugate for the diagnosis of camel pox using immunofluorescence assay (ELISA).

Tasks. To achieve the goal, the following tasks were set: to obtain specific serums on different species of animals; isolate immunoglobulins from specific sera; prepare a conjugate and check their activity.

Methods. In the course of the work, specific sera against camel pox virus were produced in sheep and rabbits, their activity in the diffuse precipitation reaction (DPR) was 1:8 — 1:16, respectively. Immunoglobulins were isolated from specific sera by two methods. The activity of the isolated gamma globulins was tested in the DPR, the results are presented in the table.

TABLE. EVALUATION OF ACTIVITY AND SPECIFICITY, AS WELL AS THE CONCENTRATION OF ISOLATED IMMUNOGLOBULINS

Animals	Methods	Activity in the DPR	Protein concentration mg/ml
Sheep	Cohn's alcohol method	1:8	1,67
	ammonium sulphate	1:16	1,34
Rabbit	Cohn's alcohol method	1:16	0,96
	ammonium sulphate	1:8	0,61

According to the table, it can be seen that the isolated immunoglobulins in sheep and rabbit according to the Cohn alcohol method in the DPR showed activity of 1:8 — 1:16, respectively. However, the activity of sheep immunoglobulin isolated by ammonium sulfate to the camel pox virus in the DPR turned out to be one order of magnitude more active — 1:16 than immunoglobulin isolated by the Cohn method.

The main results. On their basis, immunoperoxidase conjugates were prepared according to the Wilson and Nakana method. The limiting activity of specific conjugates in ELISA was 1:800, respectively, the working dose of a specific drug in ELISA is their eightfold dilution of 1:100, respectively.

Conclusions. In practice, prepared immunoperoxidase conjugates will be used to diagnose camel pox.

Раздел 22. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК СОИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОЕВЫХ АЛЛЕРГЕНОВ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Петецкая В.Н., Минаев М.Ю., Хвостов Д.В.

ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, 26, ул. Талалихина, 109316, Москва, Россия

Введение. Аллергические реакции на семейство бобовых являются распространенным явлением, и всесторонние обзоры выявили основные аллергены и перекрестную реактивность в пределах этого семейства [1]. К основным бобовым относятся горох, фасоль, люпин, чечевица, арахис и соя. Распространенность аллергии на бобовые зависит от локализации и вида бобовых. В Испании, где бобовые употребляются часто и рано, бобовые, как сообщалось, являются пятой по распространенности причиной пищевой аллергии у маленьких детей. В Индии нут является основным пищевым аллергеном. Аллергия на люпин варьировала от 4,1% в Средиземноморье до 1,6% в Европе. Была выдвинута гипотеза, что высокое потребление бобовых может быть причиной усиления сенсibilизации. Перекрестная реактивность бобовых также варьируется в зависимости от региона — в то время как в Средиземноморском регионе была зарегистрирована обширная перекрестная реактивность среди чечевицы, нута и гороха, в Северной Америке была отмечена лишь минимальная перекрестная реактивность среди бобовых (в основном между арахисом и соей). [1]

В законодательстве большинства стран мира действуют законы об информировании потребителя о возможном содержании аллергенов в Соединенных Штатах (Закон о маркировке пищевых аллергенов и защите прав потребителей (FALCPA)), в Европейском Союзе (Директива 2003/89/EC) и в Евразийском экономическом союзе (ТР ТС 022/2011) [2]. Согласно этим законам требуется обязательная маркировка пищевых продуктов о наличии ингредиентов из определенного списка наиболее распространенных аллергенных продуктов, включая сою (ТР ТС 022 п. 4.4 соя и продукты ее переработки).

Для рутинного определения аллергенов в пищевых продуктах используются методы ПЦР и/или ИФА. Сравнительный анализ выявления наличия сои в различных пищевых продуктах показал преимущества метода на основе ДНК перед ИФА для исключения ложноотрицательных результатов [3]. Это объясняется тем, что эпитопы, необходимые для распознавания антигенов, могут быть деформированы и связывание с антителом происходит менее эффективно. ДНК представляет более стабильную структуру, поэтому метод обнаружения аллергенов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в обработанных пищевых продуктах представляет более надежное решение. В настоящее время выявление сои в продуктах питания

производится согласно методикам выявления ГМ линий сои на основе метода ПЦР в реальном времени, где ген сои Lec1 используется в качестве гена выравнивания. Однако, у этой методики довольно низкая чувствительность на уровне 0,01%. Более того, она очень чувствительна к степени дегградации ДНК в готовой продукции.

Цель и задачи. Целью работы было разработать высокочувствительную комплексную методику выявления ДНК бобовых растений и, в случае положительного результата, дальнейшей идентификацией видоспецифичной ДНК сои. Задача исследования состояла в сравнении тест-систем для определения соевых аллергенов.

Материалы и методы. Образец Соя1 (стандартный образец, Glycine max) измельчали в ножевом гомогенизаторе GRINDOMIX GM 200 (Retsch, Haan, Germany). Навеску отбирали в количестве 100 мг. Выделение ДНК проводили с прелизисом с использованием реагентов набора Сорб-ГМО-Б (Syntol, Moscow, Russia) согласно инструкции. В дальнейшем выделение ДНК проводили на роботизированной станции MagNA Pure LC 2.0 isolation station (Roche) с использованием наборов MagNa Pure LC DNA Isolation Kit II (tissue) (Roche, Mannheim, Germany). Для определения параметров реакций и предела обнаружения были подготовлены разведения выделенной ДНК (от 10⁻¹ до 10⁻⁶) в ТЕ-буфере для ПЦР (Syntol, Moscow, Russia), которые строго привязаны к навеске образца Соя1. Праймеры к геномной ДНК Lec1 (однокопийная) были взяты из ГОСТ 31719-2012, праймеры к многокопийным участкам геномной и митохондриальной ДНК были подобраны с использованием программы PrimerBlast (GlyMAX и GlyCOX). Амплификацию проводили на амплификаторе в режиме «реального времени» «АНК», (ФГБУ «ИАП РАН», г. Санкт-Петербург).

Основные результаты. Для определения наименьшего содержания целевой ДНК в образце, которое может быть определено по методике, проводили исследование ряда десятикратных разведений ДНК (от концентрированной до 10⁻⁶), выделенной из бобов сои (Glycine max). Достоверными пределами обнаружения являются следующие концентрации, в пересчете на массу образца Соя1: с использованием пары праймеров, специфичных к участку геномной ДНК Lec — 0,05%; для пары праймеров GlyCOX, специфичных к участку митохондриальной ДНК, — 0,0025%; для пары праймеров, специфичных к многокопийному участку геномной ДНК GlyMAX — 0,0001%.

Для определения эффективности амплификации использовали зависимость значения порогового цикла (Ct) от логарифма условной концентрации ДНК матрицы, принимая за единицу концентрации неразведенную ДНК. Рассчитывали эффективность по уравнению: $E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$, где slope — наклон линейной области зависимости Ct от логарифма концентрации ДНК матрицы IgC(DNA). Для этой цели были построены градуировочные графики зависимости по результатам амплификации для всех пар праймеров с использованием программы ПО Microsoft Excel. Эффективность ПЦР реакции составила 103.6%, 95.7%, 96.3% для пар праймеров Lec1, GlyCOX и GlyMAX соответственно.

Заключение. В ходе проделанной работы была рассмотрена эффективность и чувствительность методики выявления сои на примере трех пар праймеров, подобранных к разным участкам ДНК соевых бобов. Наши исследования показали высокую эффективность до 0.96 и чувствительность до 0,0001% с использованием пары праймеров GlyMAX. ПЦР анализ обеспечивает высокую чувствительность и специфичность, что делает его идеальным выбором для широкомасштабного скрининга продуктов питания на

наличие соевых аллергенов. Эта методика может быть важной для защиты здоровья людей с аллергией на сою и обеспечения безопасности пищевых продуктов.

Благодарности. Исследования выполнены в рамках государственного задания Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова № 0437-2019-0001.

1. Abrams, E.M.; Gerstner, T.V. Allergy to cooked, but not raw, peas: a case series and review. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 2015, 11, 10, doi:10.1186/s13223-015-0077-x.

2. Pedersen, M.H.; Holzhauser, T.; Bisson, C.; Conti, A.; Jensen, L.B.; Skov, P.S.; Bindslev-Jensen, C.; Brinch, D.S.; Poulsen, L.K. Soybean allergen detection methods — A comparison study. *Molecular Nutrition & Food Research* 2008, 52, 1486-1496, doi:10.1002/mnfr.200700394

3. Scharf, A.; Kasel, U.; Wichmann, G.; Besler, M. Performance of ELISA and PCR Methods for the Determination of Allergens in Food: An Evaluation of Six Years of Proficiency Testing for Soy (Glycine max L.) and Wheat Gluten (Triticum aestivum L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013, 61, 10261-10272, doi:10.1021/jf402619d.

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО РИСА МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Акинина Т.Н.¹, Осипова Ю.А.², Солтынская И.В.², Крылова Е.В.², Вострикова О.В.¹

¹ ООО «Тест-Реагент», Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), Москва, Россия

Введение. В настоящее время в мире постоянно увеличивается количество генно-модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения. Для снижения рисков, связанных с распространением таких организмов, необходимо разрабатывать и внедрять новые методики, расширяющие спектр выявляемых трансгенных растений.

Повышение эффективности скрининга на наличие ГМО растительного происхождения можно добиться за счет определения оптимального набора генетических элементов и конструкций, характерных конкретным ГМ растениям, и применения матричного подхода к исследованиям. В частности, для выявления ГМ линий риса согласно ГОСТ Р 58958-2020 предлагается использовать сочетание пяти элементов трансгенных конструкций. При этом для сокращения временных и материальных затрат при исследованиях наиболее эффективным является использование ПЦР-тест-систем и методик в мультиплексном формате.

Цель. Разработка набора реагентов для выявления генетически модифицированного риса методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «Рис/ T-35S/ bar».

Материалы и методы. Использовали сорбционный метод выделения ДНК («ДНК-сорб-С-М») ФБУН ЦНИИЭ, «Со-

рб-ГМО-Б» Синтол). ПЦР в режиме «реального времени» проводили на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и CFX96 (BioRad, США). ПЦР валидировали в соответствии с международными требованиями для установления значимых следующих характеристик: специфичность, чувствительность, предел обнаружения, эффективность ПЦР.

Основные результаты. По результатам оценки встречаемости элементов в конструкциях ГМ риса было предложено их эффективное сочетание. Были выбраны следующие элементы: t35S — терминатор из генома вируса табачной мозаики и ген bar из *Streptomyces hygrosopicus*, кодирующий фермент фосфинотрицин-ацетилтрансферазу, который придает устойчивость к гербициду глюфосинату аммония. В качестве элемента для видоспецифичной детекции риса *Oryza sativa* выбран ген RicePLD, который кодирует фермент фосфолипазу Da2 (PLD2).

В качестве положительных контрольных образцов использовали плазмиды, содержащие целевые фрагменты p35S, bar и RicePLD. С использованием десятикратных разведений растворов данных рекомбинантных плазмид было показано, что аналитическая чувствительность ПЦР при выявлении фрагмента ДНК риса не менее 104 копий/мл, для элемента T-35S — 7*10³ копий/мл, для гена bar — 2*10⁴ копий/мл. Эффективность ПЦР — более 90%.

Специфичность ПЦР подтверждена с использованием контрольной панели, содержащей образцы более чем двадцати ГМ линий различных растений, а также образцы ДНК нетрансгенных растений, млекопитающих, птиц и рыб. Методика показала 100 % специфичность в рамках предложенной панели.

Для определения предела обнаружения тест-системы использовали модельные образцы с разным содержанием ГМ риса в не ГМ рисе, а также образцы риса в сое. Предел обнаружения составил не менее 0,05% целевого продукта в растительной матрице.

Заключение. Был разработан набор реагентов «Рис/

T-35S/ bar», предназначенный для качественного выявления терминатора t35S, гена bar, позволяющих выявить линии генетически модифицированного риса, и фрагмента ДНК риса *Oryza sativa* в продуктах питания, кормах и кормовых добавках, сельскохозяйственном сырье, в том числе отдельных частях растений (корни, стебли, листья и пр.), посадочном материале и семенах.

Внедрение в практику лабораторий данного набора в сочетании с использованием матричного подхода к анализу результатов позволит повысить эффективность выявления ГМ линий риса в рамках программы контроля качества и безопасности продукции.

КАЧЕСТВЕННОЕ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ТИЛЯПИЙ В ОДНОКОМПОНЕНТНОЙ РЫБНОЙ ПРОДУКЦИИ

Козлова А.Д., Красникова М.С., Горбачева Н.С., Брюсова М.Б., Долинская К.Г., Яцентюк С.П.

ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», Москва, Россия

Ассортимент рыбы и рыбной продукции в настоящее время чрезвычайно разнообразен. На российские прилавки товары попадают со всего мира, при этом, все больше продукции завозится из Азии, Африки и Южной Америки. Именно эти регионы являются ключевыми для производства тилапии. Тилапия — это несколько видов пресноводных рыб, относящихся к разным родам одного семейства цихлид. Эти рыбы всеядны и по неприхотливости выращивания уступают только карпу, что делает их все более распространенным в аквакультуре и сравнительно дешевым товаром [1].

В последние годы в мировом масштабе все чаще является проблема, связанная с преднамеренной подменой рыбной продукции — заменой более ценного вида рыбы на менее ценный [2, 3]. И если свежую необработанную рыбу просто отличить по морфологическим и анатомическим характеристикам, то в обработанном виде рыба и рыбная продукция зачастую утрачивает характерные черты, необходимые для подтверждения идентичности. Правильная маркировка и соответствие продукции важно для потребителей и контрольных органов. Таким образом, все большее значение приобретает идентификация рыбной продукции лабораторными методами.

Ранее в научной литературе сообщалось об использовании анализа белкового состава для идентификации видов рыб. Использовали изоэлектрическое фокусирование в иммобилизованных градиентах pH, двумерный электрофорез и иммуноферментный анализ. Тем не менее, основанные на анализе белков аналитические методы для идентификации видов рыб ограничены из-за денатурации белков во время тепловой обработки.

В последнее время для характеристики видов рыбной продукции активно используются методы на основе технологий амплификации ДНК [4]. По сравнению с методиками анализа белкового состава методики на основе ДНК дают более четкий результат, т.к. ДНК более стабильна при термической обработке. Кроме того, высокое содержание в образцах митохондриальной ДНК позволяет успешно ис-

пользовать методики на основе анализа мтДНК даже для процессированных продуктов.

Целью нашей работы являлась разработка методики качественного выявления генетического материала рыб тилапий родов *Oreochromis* и *Sarotherodon* в различных однокомпонентных продуктах (фарш, филе).

Материалы и методы. В работе для проверки специфичности использован генетический материал следующих рыб: тилапия, треска, омуль, пангасиус, лещ, минтай, камбала, горбыль, макрель, чир, сиг, масляная, жерех, сом, навага, скумбрия, тунец, горбуша, форель, баррамунди, карась, черный марлин, салака, угорь.

Выделение суммарной ДНК проводили из свежего и замороженного филе и однокомпонентного фарша рыбы коммерческими наборами: Проба-Рapid (ДНК-технология), ДНК-Сорб-СМ (Амплисенс), Рибо-преп (Амплисенс).

Амплификацию и детекцию продуктов амплификации проводили с использованием реагентов производства «BelBioLab» на приборах CFX96 (Bio-Rad, США) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

Результаты. На основании множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей разных видов рыб, представленных в базе данных GenBank, в качестве гена-мишени была выбрана область митохондрия — ген цитохромоксидазы 1 (COX1). С помощью интернет-сервиса Nucleotide BLAST online была показана высокая степень гомологии только с митохондриальными генами рыб родов *Oreochromis* и *Sarotherodon*.

Для контроля качества выделения ДНК и предотвращения получения ложноотрицательных результатов в ПЦР-смесь были введены праймеры и зонд для амплификации и детекции внутреннего контрольного образца (ВКО). В качестве мишени для ВКО использовали фрагмент гена Vista Enhancer hs289, который может функционировать как энхансер. Этот локус представляет собой консервативный для позвоночных животных геномный элемент и может активировать промотор Hsp68, связан-

ный с репортерным геном LacZ, у трансгенных мышей. Детекция генетического материала рыб родов *Oreochromis* и *Sarotherodon* регистрируется по каналу Yellow, а внутреннего контрольного образца по каналу Green.

Так как скорость проведения анализа является важным критерием выбора метода исследования нами были протестированы разные способы выделения суммарной ДНК из пищевой продукции. Было проведено сравнение трех методов выделения ДНК из филе разных видов рыб — преципитационный (Рибо-преп, Амплисенс), сорбентный с протеиназой (ДНК-сорб-СМ, Амплисенс) и экспресс-метод (Проба-Рapid, ДНК-технология). Выделение набором Рибо-преп проводили из 10% суспензии образца в физ. растворе. Выделение ДНК наборами Проба-rapid и ДНК-сорб-СМ проводили из 0,1 г фрагмента образца рыбной продукции. В результате все методы показали достаточную степень очистки суммарной ДНК для данной методики. Наименьшее время, затрачиваемое на выделение ДНК наблюдалось у набора Проба-Рapid. Таким образом, для уменьшения времени исследования замороженного и охлажденного рыбного филе и однокомпонентного фарша можно рекомендовать использование экспресс-метода, который позволяет проводить экстракцию ДНК из фрагмента образца в течение 15 минут.

Для подтверждения специфичности работы выделенных олигонуклеотидов, выявляющих рыб родов *Oreochromis* и *Sarotherodon* была исследована панель образцов из 30 различных видов промысловых рыб,

относящихся к отрядам *Acanthuriformes*, *Beloniformes*, *Carangiformes*, *Cypriniformes*, *Esociformes*, *Gadiformes*, *Icosteiformes*, *Moroniformes*, *Perciformes*, *Pleuronectiformes*, *Salmoniformes*, *Scombriformes*, *Siluriformes*. Неспецифических реакций амплификации на данной панели выявлено не было. Все образцы тилапий были выявлены корректно.

Таким образом, разработанная методика позволяет быстро исключать подмену рыбами родов *Oreochromis* и *Sarotherodon* монокомпонентной продукции (филе, фаршей). Однако, данная методика не рекомендована для анализа многокомпонентной продукции.

1. ФАО. 2018. Состояние мирового рыболовства и аквакультуры 2018 — Достижение целей устойчивого развития. Рим. Лицензия:CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

2. Spencer Erin T. and Bruno John F. Fishy. Business: Red Snapper Mislabeling Along the Coastline of the Southeastern United States. *Frontiers in Marine Science*. 2019. Vol. 6. Art. 513. doi: 10.3389/fmars.2019.00513

3. Капитова И.А., Куликовская Т.С., Потехина Р.Н. Методы выявления фальсификации рыбы и рыбной продукции. Безопасность и качество товаров Материалы XIII Международной научно-практической конференции. 2019. С. 115-120.

4. Cermakova E, Lencova S, Mukherjee S, Horka P, Vobruba S, Demnerova K, Zdenkova K. Identification of Fish Species and Targeted Genetic Modifications Based on DNA Analysis: State of the Art. *Foods*. 2023 Jan 3;12(1):228. doi: 10.3390/foods12010228. PMID: 36613444; PMCID: PMC9818732.

ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК КУР МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ В СТЕРИЛИЗОВАННЫХ КОНСЕРВАХ И РАСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА МЯСНОГО ИНГРЕДИЕНТА КУР

Минаев М.Ю., Фомина Т.А.

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, 109316, Москва, Россия

Введение. Основной проблемой исследования стерилизованной консервированной продукции методами на основе анализа ДНК, в частности определение ДНК кур методом ПЦР в реальном времени, является деградация ДНК вследствие технологических процессов производства данной продукции, что осложняет или делает невозможным получение экспериментальных данных и/или их интерпретацию. С проблемой деградации ДНК сталкиваются в разных областях исследований, например, исследования палеонтологических и археологических находок, мумифицированных останков и засохших растений, в образцах которых, ученые анализируют нуклеотидные последовательности, так называемые, древняя ДНК. Сложность заключается в сверхмалых количествах и фрагментированности ДНК в древних образцах, а также наличие химических модификаций, блокирующих репликацию древней ДНК *in vitro*. В области криминалистики, в ряде особо сложных случаев, проблемы возникают с образцами, которые подверглись сильному температурному воздействию, например, вовремя пожаров. Так, при воздействии высоких температур на кость, количество

амплифицированной ДНК целевого фрагмента снижается на 8-10 циклов [1,2,3]. Снижение количества амплифицированной ДНК, было подтверждено и нашими исследованиями при изучении уровня деградации ДНК в рыбных консервах. Было установлено, что уровень деградации ДНК зависит в первую очередь от температуры обработки и времени воздействия на продукт, т.е. от F-эффекта (стерилизующий эффект). Зная этот параметр, можно предсказать уровень температурной деструкции видоспецифической ДНК [4]. В настоящее время, при обширном внедрении методов ДНК анализа в область контроля состава пищевых продуктов, качественного метода, позволяющего определить наличие ДНК незаявленного на этикетке мясного ингредиента, становится недостаточно. Для объективной оценки, требуется количественный или полуколичественный анализ, который даст возможность различить преднамеренную фальсификацию от технологической примеси, устранение которой экономически неприемлемо для мясной отрасли. Для этих целей была разработана количественная методика (внесена в реестр методик измерений за номером ФР.1.31.2021.40884) [5].

Суть методики заключается в определении диапазона измерения относительно стандартного матричного образца мяса кур (11707-2021). Однако, при исследовании консервов, в которых ДНК в той или иной степени деградирована, ей пользоваться нельзя вследствие снижения количества амплифицированной ДНК, что смещает циклы амплификации (Ct) в сторону увеличения, тем самым при расчете содержания матричной ДНК в образце, на основе простроенного калибровочного графика по значениям Ct, мы получаем ложные результаты. Технологическая документация (ГОСТ, ТУ) на производство консервов, содержащих мясо, предусматривает стерилизующий эффект при их производстве в диапазоне от 14 до 24 условных минут, на практике в среднем от 16 до 22. Исходя из этих данных, была оценена степень деградации ДНК и возможность количественного определения с использованием соответствующего, по степени деградации матричной ДНК, стандартного образца.

Цель и задачи. Целью работы было определить уровень деградации митохондриальной ДНК в мясной продукции и его стабильность при F-эффекте 21 ± 3 .

Материалы и методы. Для приготовления опытных и контрольных образцов использовали большую грудную мышцу кур разных производителей. Все образцы гомогенизировали в ножевом гомогенизаторе

GRINDOMIX GM 200 (Retsch, Haan, Germany). Полученный фарш для опытных образцов загружали в емкость, подогревали до температуры $(85 \pm 5)^\circ\text{C}$. Подогретую массу фасовали в стеклянные банки массой нетто 100 г в соответствии с ГОСТ 13534 и укупоривали. После фасовки и укупорки стеклянные банки подвергали стерилизации в автоклавах при следующем режиме: подогрев — 15 мин/стерилизация — 45 мин/охлаждение — 30 мин; температура стерилизации — $(121)^\circ\text{C}$; противодавление — 0,21 МПа. Величина достигнутого стерилизующего эффекта составляла 18 и 24 условных минут. Контрольные образцы тепловой обработке не подвергались. Навеску сырого и обработанного мяса отбирали в количестве 100 мг. Выделение ДНК проводили на роботизированной станции MagNA Pure LC 2.0 isolation station (Roche) с использованием наборов MagNa Pure LC DNA Isolation Kit II (tissue) (Roche, Mannheim, Germany), с этапом лизиса вне прибора. Праймеры к митохондриальной и геномной ДНК, режимы амплификации и учет результатов согласно методике ФР.1.31.2021.40884. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе в режиме «реального времени» «АНК», (ФГБУ «ИАП РАН», г. Санкт-Петербург)

Основные результаты. Результаты амплификации ДНК, выделенной из образцов сырого мяса кур и прошедших термическую обработку, представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК. ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ДЕГРАДАЦИИ ДНК ПОД ДЕЙСТВИЕМ СТЕРИЛИЗУЮЩЕГО ЭФФЕКТА

Объект исследования		Цикл амплификации (Ct)	ΔCt (обработанный — сырой) min/max	ΔCt (F-эффект=24 — F-эффект=18)
Образец 1	Сырой фарш	13,86	4,23	0,57
	Обработка с F-эффект=18	17,52		
	Обработка с F-эффект=24	18,09		
Образец 2	Сырой фарш	13,70	4,35	0,43
	Обработка с F-эффект=18	17,62		
	Обработка с F-эффект=24	18,05		
Образец 3	Сырой фарш	13,28	4,64	0,52
	Обработка с F-эффект=18	17,40		
	Обработка с F-эффект=24	17,92		

Как видно из табл.1 митохондриальная ДНК действительно фрагментируется в процессе тепловой обработки (стерилизации), что приводит к увеличению показателя Ct видоспецифической реакции. При этом существенной разницы в степени фрагментации ДНК между двумя режимами стерилизации с F-эффектом 18 и 24 условных минут не наблюдалось, $\Delta\text{Ct}_{\text{cp}}=0,5$.

Заключение. В ходе проделанной работы было подтверждено, что высокая температурная обработка мясной продукции приводит к частичной фрагментации митохондриальной ДНК, что может сказываться как на чувствительности метода, так и невозможности количественной оценки незаявленных мясных ингре-

диентов без использования соответствующего стандартного образца, прошедшего аналогичную термическую обработку.

1. Григоренко, А.; Боринская, С.; Янковский, Н.; Погаев, Е. Достижения и особенности в работе с древней ДНК и ДНК из сложных криминалистических образцов. *Acta Naturae* (русскаяязычная версия) 2009, 1, 64-76.

2. Земскова Е.Ю., Бордюков М.М., Ковалев А.В., Иванов П.Л. Молекулярно-генетический анализ митохондриальной ДНК в обожженных костях: еще раз о пределах возможного. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2018;61(2):21-25

3. Nguyen-Hieu, T.; Aboudharam, G.; Drancourt, M. Heat degradation of eukaryotic and bacterial DNA: an experimental

model for paleomicrobiology. *BMC Research Notes* 2012, 5, 528, doi:10.1186/1756-0500-5-528.

4. Fomina T. A., Kornienko V. Yu., Minaev M. Yu. Methods of molecular diagnostics for fish species identification. *Food systems*. 2020; 3(3): 32–41. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2020-3-3-32-41>

5. Методика № 241.0067/RA.RU.311866/2021. Выявление ДНК кур и расчет количества мясного ингредиента кур в мясной продукции, выработанной по национальным и межгосударственным стандартам (за исключением консервов), методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА *ASPERGILLUS ORYZAE* RCAM 01134 В ПРОИЗВОДСТВЕ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОСНОВЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЕНОМНОГО АНАЛИЗА

Гурзу З.Г., Багрянцева О.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение наук «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), Москва, Россия

Актуальность. В настоящее время для характеристики производственных штаммов, включая таксономическую идентификацию и выявление у них детерминант патогенности, антибиотикорезистентности, аллергенности, способности к токсинообразованию, вместе с данными микробиологических и токсикологических исследований, используются результаты полногеномного секвенирования (WGS) микроорганизмов [1]. В Российской Федерации, в соответствии с МУ 2.3.2.1830-04 секвенирование является дополнительным методом исследования штаммов генетически модифицированных микроорганизмов [2]. Считается, что использование WGS для оценки безопасности производственных штаммов грибов и бактерий является важным инструментом снижения рисков их использования в пищевой промышленности.

Цель. Оценить потенциальные риски, связанные с использованием технологического штамма *Aspergillus oryzae* RCAM 01134 на основе данных WGS.

Материалы и методы. Штамм — *Aspergillus oryzae* RCAM 01134 продуцент комплекса протеиназ, пептидаз и других гидролаз получен филиалом ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» ВНИИПБТ. WGS штамма проведено компанией BioSpark (г. Троицк). WGS коротких чтений Illumina проводили в формате парных концов 150 п.н. с размером вставки 350 п.н. Биоинформатическая обработка результатов WGS и сборка генома была выполнена нами на аналитической веб — платформе Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>) с использованием доступных инструментов с открытым кодом. Для поиска гомологичных последовательностей нуклеотидов и белков использовали базу данных NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Наличие генов аллергенности в составе ДНК проводилось в соответствии с библиотекой таких генов Allergome (www.allergome.org), а генов отвечающих за продукцию вторичных метаболитов — с данными библиотеки «Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG)» с помощью программы AntiSmash.

Основные результаты. В результате сборки генома *Aspergillus oryzae* RCAM 01134 *de novo* было получено 1331 контиг, общей длиной 37,5 Мб. Качество сборки оценили с помощью программы QUAST, которая показала долю по-

крытия в 96,9 %. Полноту сборки генома, включая анализ последовательностей генов, специфичных для *Aspergillus oryzae* оценивали с помощью программы BUSCO. Показано, что, полнота сконструированных наборов скаффолдов (целостности генов) составляет 99,4 %, из которых 99,2 % полные и в единственном экземпляре. Предсказание и аннотация генов были выполнены с использованием программы Funannotate. В результате было предсказано 11499 генов (мРНК — 11212 и тРНК — 287), по сравнению с типовым штаммом *A. oryzae* RIB 40, у которого 12074 гена.

С целью идентификации и подтверждения видовой принадлежности исследуемого штамма проведен филогенетический анализ ДНК исследуемого штамма. Традиционно рекомендуемый в качестве типовых генов для идентификации простейших грибов участок ITS был исключен из обработки, в связи с тем, что этот сегмент не позволяет достоверно дифференцировать виды рода *Aspergillus spp.* В качестве типового гена был выбран ген кодирующий продукцию β-тубулина, который позволяет получить более точные результаты. Последовательности генов β-тубулина были выровнены с помощью программы MUSCLE в MEGA 11. Филогенетическое дерево, построенное методом выявления минимальной эволюции в программе MEGA 11, подтвердило близкое родство изучаемого штамма с другими видами *Aspergillus oryzae* (рис.1). Обнаружены совпадения с известными в настоящее время генами *A. oryzae*, ответственными за продукцию аллергенов (BLAST 1E-10). Выявлено сходство *A. oryzae* с *A. flavus* (на основе среднегеномного нуклеотидного сходства ANI) составляющее 99,3 %, которые, как известно, являются продуцентами вторичных метаболитов — афлатоксинов. Путем анализа генов определяющих пути синтеза вторичных метаболитов у *A. oryzae* RCAM 01134 идентифицирован кластер генов определяющих биосинтез афлатоксина (≤95% идентичности на основе поиска BLASTP). Вместе с тем, ключевые гены (*norA*, *norB* и *avfA*), определяющие синтез афлатоксина, у исследуемого штамма имели низкое сходство с типовыми генами <93 % (E=0,00) и структурные мутации. Это значит, что штамм *A. oryzae* RCAM 01134 не способен продуцировать афлатоксин. Последовательности определяющих способность штамма к синтезу антибиотиков не выявлены.

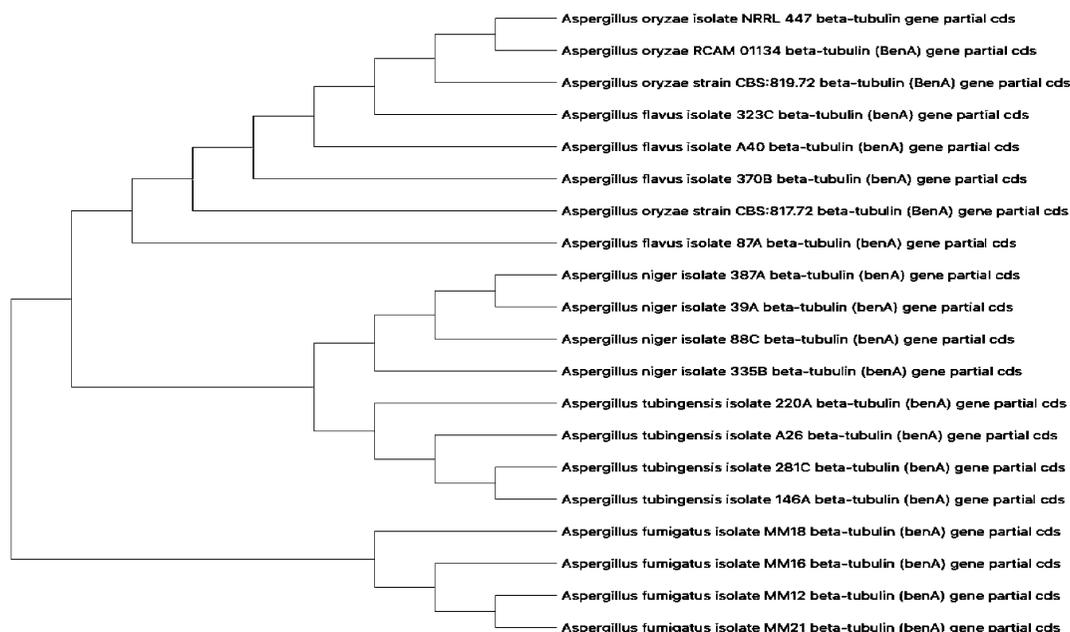


Рисунок 1. Филогенетическое дерево на основе гена β -тубулина (benA)

Выводы. На основе установленной последовательности нуклеотидов гена *BenA*, полученной с использованием WGS, было подтверждено видовое соответствие штамма *A. oryzae* RCAM01134. Вместе с тем, в связи с близким родством *A. oryzae* и *A. flavus*, для получения более точных результатов, считаем целесообразным использование геномных подходов в комплексе с традиционными методами идентификации. Показано, что в связи с частичным изменением структуры функциональных участков генов (*porA*, *porB* и *avfA*), исследуемый штамм не способен продуцировать афлатоксин. Выявление гомологий участков ДНК, ответственных за продукцию белков-аллергенов (более 80%), с известными детерминантами аллергенности позволяет предположить возможный риск аллергических

реакций у сенсibilизованных людей при потреблении пищевой продукции, производимой с использованием *A. oryzae* RCAM01134. Штамм не содержит детерминант антибиотикоустойчивости.

Список литературы:

1. Silano V, Barat Baviera JM et al., Statement on the characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes//*EFSA Journal*. 2019;17(6):5741, 13 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5741>

2. Методические указания МУ 2.3.2.1830-04 "Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов". Главный государственный санитарный врач РФ 09. 01. 2004.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВА ОБРАЗЦОВ КОФЕ В АСПЕКТЕ СООТВЕТСТВИЯ СОДЕРЖАНИЯ КОФЕИНА ЗАЯВЛЕННОМУ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ

Кузьменко Л.В.^{1,2}, Шанский Я.Д.¹, Беспярых Ю.А.^{1,2}

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Центр молекулярной медицины и диагностики, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Москва, Россия

Введение. Алкалоиды пуринового ряда (кофеин, теofilлин и теобромин), содержащиеся в бобах кофейного дерева, оказывают бодрящий эффект. Последнее обуславливает употребление кофеин содержащих продуктов в пищу. При этом, малое содержание кофеина в продукте (менее 150 мг в порции) может приводить к тому, что необходимый эффект не будет достигнут, в то время как чрезмерное употребление (более 450 мг/сутки) приведет к эффекту ажитации либо угнетенности, бессоннице, головной боли, физической слабости, тремору и психической неустойчивости [1-3].

Актуальность. Актуальным является проведение качественного и количественного анализа содержания данных веществ в пищевых продуктах с целью проверки соответствия заявленной производителем концентрации кофеина действительной. В данных целях используют метод йодометрического титрования, фотоколориметрии, спектрофотометрии, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС [1,2].

Цель и задачи. Сравнение методов количественного определения содержания кофеина в пищевом продукте — кофе различных сортов: молотом и гранулированным рас-

творимом с использованием различных методов детекции кофеина. Сопоставление экспериментальных данных с маркировкой производителя.

Материалы и методы. Готовый кофейный продукт получали растворением 6 г гранулированного кофе в 300 мл воды или 3 г молотого кофе растворяли в 50 мл воды. Для исследования были отобраны следующие образцы молотого кофе: Gevalia medium (США); Egoiste Truffle (Нидерланды); Жокей классический (Россия); Brown Weasel Company Robusta (Вьетнам) (возраст образца превышает 3 года); Царское Подворье десертный кофе «Сливочное печенье» (Россия); гранулированного растворимого Nescafe Gold (Россия).

Анализ кофеина проводили тремя методами: 1) ВЭЖХ-УФ по [1] с модификациями; 2) ВЭЖХ-МС по [3] с модификациями; 3) фотометрический согласно ГОСТ 29148-97 [4].

При использовании ВЭЖХ-УФ пробоподготовку образцов кофе проводили путем смешивания 10 мкл раствора образца с 490 мкл ацетонитрила (LiChrosolv, Германия) и 490 мкл воды I класса (LiChrosolv, Германия), после чего смесь центрифугировали и переносили супернатант в виалы. Разделение осуществляли с помощью хроматографа

Accela (ThermoFisher Scientific, США) на колонке Hypersil ODS C18 (ThermoFisher Scientific, США). Подвижная фаза — градиентная смесь воды и ацетонитрила. Детекцию проводили на УФ-детекторе (λ_{max} 273 нм). Количественный анализ осуществляли методом внешнего стандарта (концентрации стандартных растворов: 0,05, 0,1, 1,0, 10,0 и 100,0 мкг/мл).

Детектирование также проводили с помощью трехкварупольного масс-спектрометра LXQ (ThermoFisher Scientific, США) в режиме обнаружения положительно заряженных ионов. Метод ионизации — электроспрейный. Газ-носитель — гелий; оболочечный и защитный газ — азот. Количественный анализ осуществляли методом внешнего стандарта (концентрации стандартных растворов: 0,005, 0,05, 0,5, 5,0 и 10,0 мкг/мл).

Для проведения фотометрического анализа проводили пробоподготовку согласно ГОСТ 29148-97 [4]. Оптическую плотность измеряли при λ_{max} 492 нм на фотометре Allsheng ARM100 (Китай).

Основные результаты. Данные измерения содержания кофеина в исследованных образцах кофе представлены в таблице.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КОФЕИНА В ОБРАЗЦАХ КОФЕ (НА 1 Г ПРОДУКТА)

Образец	Заявленное производителем содержание, мкг/г	Измеренная концентрация, мкг/г		
		СФ	ВЭЖХ-УФ	ВЭЖХ-МС
Арабика Gevalia medium	320	123,14	н/о	—*
Арабика Egoiste Truffle	346,67	142,73	39,59	—
Арабика «Жокей» классический	306,67	156,72	н/о	—
Робуста Brown Weasel Company Robusta	—	138,53	6,24	—
Арабика, робуста Царское Подворье десертный кофе «Сливочное печенье»	333,33	—	—	759,4
Арабика Nescafe Gold гранулированный растворимый	146,67	—	—	130,0

*Здесь и далее эксперимент для данного образца по данной методике не проводился, что обусловлено ограниченностью возможностей

Можно видеть, что наибольшее содержание кофеина (39,59 мкг/г исходного продукта) наблюдается для сорта кофе Egoiste Truffle (Нидерланды) при определении по методу ВЭЖХ-УФ. Метод фотометрии показывал наиболее высокую концентрацию кофеина, в отличие от ВЭЖХ-УФ.

Выводы. Согласно полученным данным концентрация кофеина была примерно в 2 раза ниже заявленной производителем во всех образцах кофе кроме "Сливочное печенье". Пониженное содержание кофеина в образце робусты может свидетельствовать о деградации кофеина в процессе хранения, так как сорт робуста превышает арабику по количеству кофеина в 2-4 раза. Метод ВЭЖХ-МС обеспечивает наибольшую чувствительность, точность измерения, а также селективность позволяя определять следовые количества кофеина, в отличие от фотометрического, при котором определяются и другие ксантины (чувствительность подтверждается улавливанием низких концентраций приготовленных стандартных растворов).

Список литературы:

- Mendes, V.M., Coelho M., Tomé A.R., Cunha R.A., and Manadas B.. 2019. "Validation of an LC-MS/MS Method for the Quantification of Caffeine and Theobromine Using Non-Matched Matrix Calibration Curve" // *Molecules* 24, no. 16: 2863. <https://doi.org/10.3390/molecules24162863>
- Пилипенко, В.П. Сравнительная характеристика методов определения кофеина / В.П. Пилипенко, О.В. Бирик, Н.И. Прихода // *Вопросы химии и химической технологии* — 2009. — №2. — С. 89-91
- Lopez-Sanchez R., Lara-Diaz V., Aranda-Gutierrez A., Martinez-Cardona J., Hernandez J. «HPLC Method for Quantification of Caffeine and Its Three Major Metabolites in Human Plasma Using Fecal Bovine Serum Matrix to Evaluate Prenatal Drug Exposure» // *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2018, Article ID 2085059, 11 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2085059>
- ГОСТ 29148-97. Кофе натуральный растворимый. Технические условия : межгосударственный стандарт : дата введения 1999-01-01 / Минск.; 1997. — 36 с.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И ПРОДУКЦИИ АЛЬТЕРНАРИАТОКСИНОВ МИКРОМИЦЕТАМИ РОДА *ALTERNARIA* ИЗ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ ПРИ АНАЛИЗЕ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МЕТОДАМИ

Минаева Л.П., Маркова Ю.М., Седова И.Б., Чалый З.А.

ФГБУН Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), Москва, Россия

Введение. Микромицеты рода *Alternaria* широко распространены в природе, отдельные виды продуцируют альтернариатоксины (АТ), среди которых АОН, АМЕ, АЛТ, ТеА и ТЕН наиболее изучены и часто встречаются в зерновых продуктах, овощах, фруктах и семенах масличных культурах. Европейское управление по безопасности пищевых продуктов (EFSA) квалифицировало АОН и АМЕ как генотоксичные вещества, ТеА как потенциально опасный. В 2011 и 2016 гг. EFSA представило оценку риска диетического воздействия АТ на организм человека, где самые высокие уровни контаминации пищевой продукции (ПП) признаны для ТеА, наибольшее хроническое воздействие выявлено для «продуктов на основе злаков для младенцев и детей раннего возраста»; в 2022г приняты рекомендации о необходимости мониторинга АТ и изучения факторов, приводящих к их высоким уровням в ПП. В связи с этим актуальным является изучение загрязненности растительного сырья микромицетами рода *Alternaria* — продуцентами АТ и выявление токсигенных видов с использованием методов на основе молекулярного анализа.

Цель и задачи. Проведение видовой идентификации микромицетов *Alternaria* spp. из пищевого растительного сырья методами молекулярного анализа: ПЦР в реальном времени с видоспецифичными праймерами и характеристика профиля токсических метаболитов методом ВЭЖХ-МС/М

Материалы и методы. Штаммы *Alternaria* spp. исследовали методом ПЦР-РВ с видоспецифичными праймерами: A.alt-F3/ A.alt.-R1.1 (*A. alternata*, *A. tenuissima*), AAF2/ AAR3 (*A. alternata* комплекс видов), AAT-F/ AAT-R (*A. alternata*, *A. tenuissima*), AinfF3/ Ain4R (*A. infectoria*, комплекс видов), ADF2/ ADR1 (*A. dauci*), Asol F/ Asol R (*A. solani*) [3-6]. Продукцию АТ *Alternaria* spp. определяли в условиях *in vitro* на модельном субстрате (рис) [1], 5 видов МТ анали-

зировали ВЭЖХ-МС/МС в формате мультидетекции [2].

Основные результаты. Из внутренней микрофлоры образцов продовольственного зерна пшеницы и ячменя (Тамбовская обл., урожай 2021г.), а также ягод клубники были выделены 30 моноспоровых изолятов. Валидацию праймеров, кодирующих консервативные участки: рибосомальных регионов ДНК (ITS1 и ITS2), кальмодулина (cald) и основного аллергенного белка *A. alternata* (Alt a 1), проводили со штаммами с подтвержденной видовой принадлежностью из коллекции грибных культур ГКМ ВИЗР (табл. 1). По результатам анализа три вида праймеров (*A.alt-F3/ A.alt.-R1.1*; AAF2/ AAR3 и AAT-F/ AAT-R) были специфичны одновременно к *A. alternata* и *A. tenuissima* (секция *Alternaria*); праймеры *Ain3F/ Ain4R* к *A. infectoria* (секция *Infectoriae*), а праймеры ADF2/ ADR1 и Asol F/ Asol R амплифицировали одновременно ДНК *A. dauci* и *A. solani* (секция *Porri*). Среди выделенных изолятов для 12 был получен положительный результат с праймерами к секции *Alternaria*; для 21 — к секции *Infectoriae* и для одного из ячменя к праймерам вида *A. dauci*, при этом с парой праймеров к *A. solani* амплификации не было.

Исследование токсигенных свойств у выделенных изолятов выявило в условиях *in vitro* продукцию ТеА, АМЕ, АОН, АЛТ, ТЕ у 100% штаммов секции *Alternaria* из пшеницы и клубники, у изолятов из ячменя отсутствовала продукция только ТЕ; штамм *A. dauci* синтезировал АМЕ, АОН, ТЕ; при этом у изолятов из секции *Infectoriae* продукция анализируемых АТ отсутствовала (табл.1). Похожая картина наблюдалась и для коллекционных штаммов: синтез АОН, ТЕ, АМЕ обнаружен у *A. tenuissima*; ТеА, АОН, АМЕ, АЛТ, ТЕ в разных комбинациях у *A. alternata*; АОН и АМЕ у видов *A. dauci* и *A. solani*. В наибольшем количестве во всех случаях отмечена продукция ТеА.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ *ALTERNARIA* SPP. МЕТОДОМ ПЦР-РВ С ВИДОСПЕЦИФИЧНЫМИ ПРАЙМЕРАМИ И ПРОФИЛЯ ПРОДУЦИРУЕМЫХ АЛЬТЕРНАРИАТОКСИНОВ.

Origin / Number of strains (n)	Виды <i>Alternaria</i>	Праймеры <i>Alternaria</i> spp.						Продукция АТ на модельном субстрате (в порядке снижения содержания)
		Секция <i>Alternaria</i>			Секция <i>Infectoriae</i>	Секция <i>Porri</i>		
		A.alt-F3/ A.alt.-R1.1 [3]	AAF2/ AAR3 [4]	AAT-F/ AAT-R [5]	Ain3F/ Ain4R [4]	ADF2/ ADR1 [4]	Asol F/ Asol R [6]	
Пшеница/n=4	комплекс видов <i>A. alternata</i>	+	+	+	-	-	-	ТеА, АМЕ, АОН, АЛТ, ТЕ
Ячмень/ n=6		+	+	+	-	-	-	ТеА, АОН, АМЕ, АЛТ
Клубника/n=2		+	+	+	-	-	-	ТеА, АМЕ, АОН, ТЕ, АЛТ
Ячмень/ n=1	dauci	-	-	-	-	-	-	АМЕ, АОН, ТЕ

Пшеница/n=6	комплекс видов <i>A. infectoria</i>	–	–	–	+	+		–
Ячмень/ n=6		–	–	–	+	+		–
Клубника/n=5		–	–	–	+	+		–
№ MFP: Штаммы из коллекции грибных культур ГКМ ВИЗР*								
494011	<i>tenuissima</i>	+	+	+	–	–	–	АОН, ТЕ, АМЕ
455041	<i>alternata</i>	+	+	+	–	–	–	ТеА, АОН, АМЕ, АЛТ
786061		АОН, ТЕ, АЛТ АМЕ						
447021, 094161	<i>infectoria</i>	–	–	–	+			–
182021	<i>dauci</i>	–	–	–	–	+	+	АОН, АМЕ
043011, 628031	<i>solani</i>	–	–	–	–	+	+	АОН, АМЕ

Примечание: *УНУ «Государственная коллекция микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей ЦКП ИТЗР»; «+» положит. и «–» отрицат. результат.

Заключение. С применением молекулярных методов анализа ПРЦ-РВ и ВЭЖХ-МС/МС получены данные о видовом составе токсин продуцирующих микромицетов *Alternaria* spp. из пищевого сырья (пшеница, ячмень, клубника). Для всех выделенных изолятов секции *Alternaria* выявлена продукция одновременно нескольких АТ: ТеА, АМЕ, АОН, АЛТ и ТЕ; для штамма *A. dauci* (секц. Porri) продукция АМЕ, АОН, ТЕ, что было отмечено и у тест-штамма *A. solani* той же секции; все изоляты секции *Infectoriae* были не токсигенными.

Финансирование. В рамках государственного задания № FGMF-2023-0006.

Литература.

1. Минаева Л.П., с соавт. Микол. Фитопатол. 2023; 57(3): 198–209. DOI:10.31857/S0026364823030078
2. Чалый З.А., с соавт. Вопросы питания. 2021; 90(1): 33–9. <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-1-33-39>
3. Schuegger R. et al. Plant, Cell & Environment. 2006; 29(5): 909-918. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01471.x
4. Гричанов И. Я. (ред.) Высокопроизводительные и высокоточные технологии и методы фитосанитарного мониторинга. СПб: ВИЗР. 2009. 84 с.
5. Ганнибал Ф. Б., Новичкова Д. А. Вестник защиты растений. 2015; 86(4): 26-32.
6. Zur G. et al. Journal of Food Protection. 2002; 65(9): 1433-1440.

POLYMORPHISM AX-116347327 — HIGH DIFFERENTIATION ABILITY TO DIFFERENTIATE BIOLOGICAL SAMPLES BELONGING TO *SUS SCROFA SCROFA* OR *SUS SCROFA DOMESTICUS*

Kipen V.N.¹, Patrin M.M.²

¹ Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

² Maxim Medical LLC, Moscow, Russia

Introduction. In the period 2014-2016 there was a sharp depopulation of wild boar (*Sus scrofa scrofa*) on the territory of Belarus — from 80 thousand individuals (as of 2010) to about 3 thousand animals. The reason for this fact is the ongoing administrative measures for the mass destruction of this species as a potential carrier of African swine fever virus. However, wild boar continues to be an object of hunting and poaching, because its meat is considered dietary and in terms of price it is superior to that of a domestic pig.

Previously, we proposed a model that includes three SNPs and is able to differentiate biological samples belonging to *Sus scrofa scrofa* and *Sus scrofa domesticus* with high accuracy [1]. However, further search and analysis of SNPs that could be included in the test system has not lost its relevance, since the H3GA0051814 (HEPH) polymorphism is located on the X chromosome and is subject to different conditions of

inheritance than the c.367G>A (MC1R) and g.299084751C>T (NR6A1) polymorphisms located on autosomes.

Purpose of the study. Using bioinformatics methods, determine the genotype for SNP AX-116347327, evaluate its differentiating potential, and test it on small group samples of *Sus scrofa scrofa* and *Sus scrofa domesticus*.

Materials and methods. For bioinformatics analysis, animal genomes were used, which were publicly available in the SRA (Sequence Read Archive) format, which were additionally converted into the *.fasta format using the SRA-Toolkit v.2.11 package. To automate the process of searching for in silico nucleotide sequences flanking the desired allele, we used a script written in the Python v.3.10 programming language in the Jupyter Notebook software development environment. Bioinformatics analysis included of 254 *Sus scrofa domesticus* SRA files and 63 *Sus scrofa scrofa* SRA files from projects PRJNA671763, PRJNA626370,

PRJNA622908, PRJNA553106, PRJNA550237, PRJNA485589, PRJNA41185, PRJNA3 93920 PRJNA378496 PRJNA309108 PRJNA260763 PRJNA255085 PRJNA507853 PRJNA506339 PRJNA488960, PRJNA520978, PRJNA176478, PRJEB9922, PRJEB1683, PRJNA369600, PRJNA358108 PRJNA343658, PRJNA322309 and PRJNA239399, *in silico* defined genotype for SNP AX-116347327 (rs81293059, Chr.8:51261272C>T). DNA samples of 76 domestic pigs («SWINE») and 27 wild boars («WILD BOAR») served as biological material for molecular genetic research. The prevalence frequencies of genotypes and alleles in two samples were calculated. SNP differentiating potential was determined using ROC analysis in SPSS v.20.0. In the presence of the lower limit of the asymptotic 95% confidence interval of more than 0.8 for the AUC parameter (area under the curve), the polymorphism was positioned as a genetic marker with a high differentiating potential.

Main results. According to the data of molecular genetic analysis for the AX-116347327 polymorphism, the prevalence of the CC genotype in the «SWINE» was 76.4%, the CT genotype was 19.7%, and the TT genotype was 3.9%. Accordingly, the frequency of the C allele was 86.2%, the T allele frequency was 13.8%.

For the AX-116347327 polymorphism, the prevalence of the TT genotype in the «WILD BOAR» was 100%; the CC and CT

genotypes were not found. Accordingly, the T allele frequency was also 100%.

The value of the AUC parameter was 0.980 (p-level—1.47E-13). Based on the bioinformatics analysis, the differentiating potential of this SNP turned out to be comparable, the AUC value was 0.861 (p-level—4.22E-15).

Conclusion. Thus, the differentiating potential of SNP AX-116347327 (rs81293059, Chr.8:51261272C>T) for distinguishing biological samples belonging to *Sus scrofa scrofa* and *Sus scrofa domesticus* was confirmed on practical material. In the future, it is planned to expand research in this area: increase the samples and conduct a joint analysis of several SNPs to modify the previously proposed differentiation model.

Bioinformatics analysis was carried out as part of research work B23-060 (BRFFR, 2023-2025)

References:

1. Kipen V.N., Ivanova E.V., Snytkov E.V., Verchuk A.N. Analysis of HEPH gene polymorphism on the X chromosome for identification of wild boar and domestic pig // Russian Journal of Genetics. 2020. V.56(9). pp.1099-1108. DOI: DOI: 10.1134/S1022795420080062

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БАКТЕРИЙ ВИДА *SALMONELLA ENTERICA*

Сулдына Е.В., Феоктистова Н.А., Ломакин А.А., Мاستиленко А.В., Богданов И.И.

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, Ульяновск, Россия

Введение. *Salmonella enterica* является одной из ведущих причин болезней пищевого происхождения. Гастроэнтерит и диарейные заболевания сальмонеллезной этиологии ежегодно регистрируются более 90 миллиона раз и вызывают более 150 тысяч смертей во всем мире. В России среднегодовая заболеваемость сальмонеллезом составляет 24±2 случаев на 100 тысяч населения. Более 75% вспышек связаны с контаминацией продуктов питания животного и растительного происхождения. В связи с этим разработка новых тест систем для обнаружения патогенна методом ПЦР-РВ в пищевых продуктах, особенно с коротким сроком хранения, остается по-прежнему актуальной.

В настоящий момент на отечественном рынке представлен ряд систем для идентификации сальмонелл методом ПЦР в режиме реального времени, однако предназначены они либо для обнаружения бактерий рода *Salmonella* («ООО НПФ ЛИТЕХ», Синтол), либо для обнаружения отдельных сероваров (ВЕТСКРИН. Сальмонелла-typhi («ООО НПФ ЛИТЕХ»). Также представлены наборы с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле (ПЦР-Ф-САЛЬМОНЕЛЛЕЗ-ФАКТОР (ВЕТ-ФАКТОР).

В связи с этим, целью данной работы стала разработка тест-системы для детекции бактерий вида *Salmonella enterica* методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени».

Материалы и методы. В работе анализировали референс-штамм *Salmonella enterica* ATCC 13076 полученный

из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы УлГАУ. А также 13 полевых штаммов, выделенных нами самостоятельно и идентифицированных как *Salmonella enterica* по биологическим свойствам. В опыте использовали культуры, выращенные в условиях термостата при температуре 35±10С в течение 18-24 часов. Концентрация бактерий в 1 мл суточной культуры составляла 5,0±0,2×10⁹ КОЕ/мл.

Штаммы-ассоцианты из музея культур кафедры: *Pasteurella multocida* D, *Klebsiella pneumoniae* C6, *Bordetella avium* ATCC BAA –1003, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384, *Salmonella infantis* 3, *Enterococcus faecalis* 517, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 23715, *Yersinia enterocolitica* OR 9.

Выделение ДНК бактерий осуществляли с помощью набора реагентов «Набор для выделения НК из мазка/соскоба эпителиальных клеток, вирусов на магнитных частицах» (Биолабмикс, Россия).

Для постановки ПЦР применяли реакционную смесь «БиоМастер» (Биолабмикс, Россия) и стандартный набор лабораторного оборудования и расходных материалов.

Множественное выравнивание гена, кодирующего регулятор транскрипции *hemolysin III family protein Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain CVM N17S111* проводили в Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 и UGENA 44.0.

Основные результаты. Для разработки системы праймеров первоначально был проанализирован геном

бактерий *Salmonella enterica* и выбран оригинальный участок ДНК *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* strain *CVM N17S111*: 823,002..823,661 п.н. Этот участок ДНК кодирует регулятор транскрипции *hemolysin III family protein*. По данным *in-silico* анализа наибольшая идентичность данного региона соответствует белку геномов бактерий *Salmonella enterica*.

На основании полученной последовательности ДНК указанного выше фрагмента гена были подобраны праймеры для проведения ПЦР с помощью ресурса NCBI BLAST-primer. Их специфичность была проверена так же при помощи этого сайта.

После серии экспериментов был отработан и оптимизирован протокол для проведения ПЦР в режиме «реального времени» с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. Разработанный протокол включал использование экстрагированной ДНК бактериального штамма *Salmonella enterica* ATCC 13076 и следующие параметры постановки реакции:

- 1) предварительная денатурация — 95 °С — 5 минут,
- 2) денатурация — 95 °С — 5 сек, отжиг — 60 °С — 15 сек — 30 циклов.

Так же был произведен подбор оптимальной концентрации праймеров и изучена их видоспецифичность. Нами были взяты следующие концентрации праймеров 3 pM, 4 pM, 5 pM, 6 pM, 7 pM. каждого на реакцию. В результате подбора оптимальной концентрации праймеров было установлено, что увеличение концентрации праймеров не влияет на эффективность реакции, поэтому в наших дальнейших исследованиях были использована концентрация 3 pM каждого праймера на реакцию.

Для подтверждения специфичности подобранной системы праймеров были использованы следующие штаммы бактерий: *Pasteurella multocida* D, *Klebsiella pneumoniae* C6, *Bordetella avium* ATCC BAA - 1003, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384, *Salmonella infantis* 3,

Enterococcus faecalis 517, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 23715, *Yersinia enterocolitica* OR 9. Специфичность разработанных праймеров составила 100%.

Для определения чувствительности разработанной системы, с помощью программы UGENE и ресурса Oligoevaluator был подобран олигонуклеотидный зонд CGAATGCGGGTATGACGGCTA, в качестве флуоресцентного красителя был использован ROX, гасителя ВHQ-2. После серии экспериментов была подобрана его оптимальная концентрация, которая составила 0,4 pM. Определены показатели цикла для постановки ПЦР-РВ с флуоресцентным зондом:

- 1) предварительная денатурация — 95 °С — 5 минут
- 2) денатурация — 95 °С — 5 сек, отжиг — 60 °С — 15 сек — 50 циклов.

В результате проведенных исследований, установлено, что чувствительность системы праймеров с зондом составила 102 копий/мл.

Для определения степени эффективности разработанной системы праймеров и зонда использовали 1 референсный и 13 полевых штаммов бактерий, ранее идентифицированных по биологическим свойствам в бактериологических исследованиях как *Salmonella enterica*. Результат составил 100%.

Выводы. Таким образом, авторами была разработана и апробирована оригинальная система праймеров и зонд для детекции *Salmonella enterica* методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ). Оптимизированы протоколы для проведения ПЦР-РВ как в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green, так и с использованием флуоресцентного зонда. Специфичность подобранной системы праймеров составила 100%. Чувствительность реакции 102 копий.

Исследования проводились в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2022 году.

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДИК ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ДНК ЖИВОТНЫХ В МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ

Солтынская И.В.¹, Богомазова А.Н.^{1,2}, Крылова Е.В.¹, Кирсанова Н.А.¹, Тимофеева И.А.¹, Путинцева А.В.¹, Зайцева Е.В.¹, Гергель М.А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), Москва, Россия

² ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю. М. Лопухина, Москва, Россия

Введение. В настоящее время пищевая промышленность превратилась в отрасль, где в производстве продуктов питания, как правило, участвует цепочка производителей, что всегда несет риски ассортиментной фальсификации. Распространенная форма недобросовестного поведения производителей мясной продукции — подмена мяса одного вида животного мясом другого вида (видовая фальсификация). Для определения сырьевого состава мясной продукции разработано множество

методик и тест-систем на основе ПЦР, основанных на выявлении видоспецифичных последовательностей ДНК. Такие методики могут выполняться как в качественном, так и в количественном формате. Качественный позволяет детектировать наличие в пище мяса, не заявленного в составе, и определить соответствие информации, вынесенной на этикетку. Количественный формат дает возможность отличить фальсификацию от контаминации продукта на технологической линии. В России пока законодательно

не закреплено понятие технологической примеси при определении сырьевого состава продукции. Но в настоящее время обсуждается внесение положений о технологической примеси и следовых количествах мясных ингредиентов и их нормативных значений в ТР ТС 034/2013 «О безопасности мяса и мясной продукции». Однако, до недавнего времени стандартизованных методик количественного или полуколичественного определения сырьевого состава мясной продукции в России не существовало и требовалась их разработка.

Цель. Разработка методики полуколичественной оценки содержания ДНК быка домашнего, ДНК свиньи и ДНК лошади в мясной продукции методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Материалы и методы. Для исследований использовали панель образцов сырого мяса, субпродуктов, обработанного, лиофилизированного мяса, модельных сырых и обработанных образцов с различным содержанием говядины, свинины, конины, а также образцы пищевой продукции из торговых сетей. Для выбора и анализа целевых последовательностей использовали референсные репрезентативные геномы, опубликованные в базе Genbank NCBI. Анализ полиморфизма в целевых последовательностях включал множественное выравнивание последовательностей при помощи программы Ugene (Okonechnikov et al, 2012) и алгоритма Clustal omega (Sievers, 2014). Для выбора праймеров и оценки их качества использовали ресурсы PrimerQuest Tool (IDT), PCR Primer Stats, Eurofinngenomics Oligo Analysis Tool. Специфичность праймеров оценивали при помощи онлайн-ресурса «NCBI Primer-Blast». Для практического исследования методики на специфичность создали контрольную панель образцов, включающей ДНК из тканей млекопитающих, птиц, рептилий, рыб, ракообразных, головоногих моллюсков и растений. Выделение ДНК осуществляли сорбционным методом («Сорб-ГМО-Б», Синтол, «ДНК-сорб-С-М», ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Качество и количество выделенной ДНК оценивали на спектрофотометре Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, США). Видовая принадлежность образцов ДНК животных была верифицирована секвенированием фрагмента гена *cytB* по Сенгеру с использованием генетического анализатора «ABI PRIZM 3130xl Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США). ПЦР в режиме «реального времени» проводили на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

Основные результаты. Была разработана методика, основанная на сравнении содержания ДНК целевого животного и ДНК внутреннего контроля, которым служит консервативный у млекопитающих и птиц участок генома. Оба целевых участка детектируют в одной пробирке в двух независимых ПЦР с использованием специфичных праймеров и зондов типа TaqMan.

В качестве специфичного для быка домашнего участка геномной ДНК выбран фрагмент однокопийного гена *RPL6*, кодирующего рибосомальный белок L6 большой субъединицы 60S. Специфичный для лошади — фрагмент однокопийного гена *RPS6*, кодирующий рибосомальный белок S6 малой субъединицы 40S. Специфичный для свиньи — фрагмент однокопийного гена *Por1*, который кодирует один из белков рибонуклеазного комплекса, уча-

ствующего в процессинге транспортной РНК. В качестве универсального внутреннего контроля выбран высококонсервативный у млекопитающих и птиц однокопийный тканеспецифичный энхансер VE-1800, который функционирует в раннем эмбриональном развитии.

Параллельно с анализируемой пробой проводят ПЦР с тремя калибровочными стандартными образцами, которые представляют собой смеси рекомбинантных плазмид с участком соответствующего видоспецифичного гена и фрагмента внутреннего контроля, где содержание плазмиды с видоспецифичным фрагментом составляет 10,0%, 1,0% и 0,1% от количества плазмиды с фрагментом внутреннего контроля соответственно. На основании разницы значений порогового цикла для видоспецифичной последовательности и внутреннего контроля калибровочных стандартных образцов строится калибровочная прямая, с помощью которой рассчитывается относительное содержание ДНК искомого животного (% ДНК) в анализируемых пробах.

В серии экспериментов на модельных образцах из контрольной панели и на плазмидной ДНК подобраны оптимальные соотношения концентраций праймеров и зондов и условия мультиплексных ПЦР, определены аналитические характеристики методики. Предел аналитической чувствительности при детекции фрагментов ДНК быка домашнего и свиньи составил 50 копий/реакцию, фрагмента ДНК лошади — 100 копий/реакцию. Предел обнаружения — 0,01 % ДНК целевого животного для сырой мясной продукции, 0,05 % ДНК для продукции, подвергавшейся кулинарной обработке (кроме консервированной). В рамках предложенной контрольной панели образцов ДНК разработанная методика показала 100% специфичность.

Для определения предела полуколичественной оценки содержания ДНК целевых животных использовали растворы ДНК, выделенной из модельных образцов с содержанием целевого животного на пределе обнаружения методики, определяли коэффициент вариации RSD (должен быть не более 25%). Предел полуколичественной оценки содержания ДНК целевых животных составил 0,1% ДНК для всех видов мясной продукции (кроме консервированной), диапазон полуколичественной оценки 0,1 % — 10,0 % ДНК.

Заключение. Разработанная методика утверждена в ФГБУ «ВГНКИ» как пригодная к исследованию мясной продукции (мясо, сырье на всех этапах переработки, колбасные и кулинарные изделия, полуфабрикаты), в том числе подвергавшейся термической обработке. Методика не распространяется на консервированную продукцию и не предназначена для качественного выявления видоспецифичной ДНК.

Методика легла в основу ГОСТ Р 70296-2022 «Производство пищевая. Метод полуколичественной оценки содержания ДНК кур, быка домашнего, свиньи, лошади в мясной продукции, в том числе из мяса птицы», вступившего в действие 01 декабря 2022 года. Стандарт будет использоваться в рамках программ государственного мониторинга безопасности пищевых продуктов и позволит дифференцировать возможную фальсификацию мясной продукции от следовых количеств незаявленных мясных ингредиентов.

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ AQUADVANTAGE SALMON

Путинцева А.В.¹, Кирсанова Н.А.¹, Богомазова А.Н.^{1,2}, Крылова Е.В.¹, Солтынская И.В.¹, Гергель М.А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), Москва, Россия

² ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю. М. Лопухина, Москва, Россия

Введение. С 2016 года в Канаде и с 2021 года в США производится и продается генетически-модифицированный (ГМ) атлантический лосось линии AquAdvantage. В связи с этим существует риск импорта в РФ продукции, содержащей ГМ лосось, в том числе, через третьи страны, что сделало актуальной разработку методики его выявления на основе эффективного и надежного метода ПЦР в режиме «реального времени».

Цель. Разработка методики выявления ГМ атлантического лосося линии AquAdvantage в пищевой продукции, сырье и кормах для животных методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы рыбной продукции, в том числе, термически обработанной; сырья для ее производства на всех этапах переработки; рыбных полуфабрикатов; кулинарных рыбных изделий (кроме паштетов), а также корма для животных (кроме паштетов). Для выбора праймеров и зондов использовали референсные репрезентативные геномы, опубликованные в базе Genbank NCBI. Подбор и оценку качества олигонуклеотидных праймеров и зондов производили на онлайн-ресурсах «Eurofinsgenomics PCR Primer Design», «IDT OligoAnalyzer», «PCR Primer Stats», «Eurofinsgenomics Oligo Analysis Tool». Специфичность праймеров и зондов оценивали при помощи онлайн-ресурса «NCBI Primer-Blast» и практически на контрольной панели образцов, включающей ДНК из тканей различных рыб, млекопитающих, птиц, ракообразных, головоногих моллюсков и растений. Выделение ДНК осуществляли сорбционным методом («Сорб-ГМО-Б», Синтол, Россия). Качество и количество выделенной ДНК оценивали на спектрофотометре Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, США). Видовая принадлежность образцов ДНК животных была верифицирована секвенированием по Сенгеру фрагмента гена с использованием генетического анализатора «ABI PRIZM 3130xl Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США). Образцы из торговых сетей были проанализированы на наличие ДНК лосося атлантического с помощью набора реагентов для обнаружения ДНК рыб семейства Лососевых «Salvelinus spp/ Oncorhynchus kisutch/ Salmo salar Ident RT multiplex» (Синтол, Россия). ПЦР в режиме «реального времени» проводили на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

Основные результаты. В ходе данной работы была разработана методика, основанная на применении мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени» для выявления фрагмента генетической конструкции, характерной для ГМ лосося атлантического линии AquAdvantage, совместно с выявлением двух последовательностей эн-

догенных внутренних контролей. Три фрагмента ДНК детектируются в одной пробирке в трех независимых ПЦР с использованием специфичных праймеров и зондов типа TaqMan.

ГМ лосось линии AquAdvantage содержит в своем геноме одну копию генно-инженерной вставки, в которой кодирующая последовательность гена гормона роста Gh1 чавычи *Oncorhynchus tshawytscha* соединена с промотором и терминатором гена Afp американской бельдюги *Zoarcetes americanus* (Yaskowiak E. S. et al, 2007). В качестве последовательностей для внутренних контролей использовали также однокопийные геномные последовательности.

Первый внутренний контроль выбран с целью подтверждения в исследуемом образце наличия ДНК лосося атлантического (*Salmo salar*). Набор олигонуклеотидов для ПЦР был подобран к окрестностям 2-го экзона гена Rps10, кодирующего один из белков, входящих в состав малой субъединицы рибосомы. В области отжига обратного праймера и 3'-конца зонда последовательность атлантического лосося резко отличается от последовательностей родственных рыб, что обеспечивает высокую специфичность набора олигонуклеотидов.

Второй внутренний контроль выбран для подтверждения наличия в образце ДНК животного происхождения, качество которой приемлемо для получения ПЦР продукта. В качестве мишени был выбран энхансер VE289, последовательность которого является ультраконсервативной среди позвоночных. Множественное выравнивание фрагментов последовательностей элемента VE289 костистых рыб, млекопитающих и птиц показало, что на данном участке наблюдается 100% идентичность практически всех последовательностей.

Подбор праймеров и зонда для выявления трансгенной конструкции осуществляли таким образом, чтобы праймеры были локализованы в разных экзонах транскрипта гена Gh1 чавычи, а зонд отжигался на стыке экзонов. Такой дизайн праймеров и зонда позволяет детектировать исключительно наличие генно-инженерной вставки в геноме. Дополнительным преимуществом такого дизайна праймеров является то, что при отсутствии ДНК ГМ лосося AquAdvantage для разработки методики возможно использовать ДНК лососевых рыб, у которых последовательность гена гормона роста Gh1 является высоко консервативной.

Проведена оптимизация условий амплификации, включавшая подбор соотношения компонентов реакции и температуры отжига олигонуклеотидных праймеров в мультиплексном формате.

Аналитическую чувствительность и эффективность определяли с использованием разведений плазмид с известной концентрацией, содержащих соответствующие клонированные целевые фрагменты генетической конструкции, ДНК лосося атлантического и VE289, и геномной ДНК лосося атлантического. Предел аналитической чувствительности при детекции фрагмента трансгенной конструкции и фрагмента ДНК *S.salar* составил 80 копий/реакцию, фрагмента внутреннего контроля VE289 — 150 копий/реакцию, эффективность ПЦР — более 90%. На основе смеси растворов плазмидной ДНК разработан ПКО для системы детекции.

В рамках предложенной контрольной панели образцов ДНК разработанная методика показала 100% специфичность. Дополнительно для оценки возможности применения методики для испытания образцов обработанной продукции проводили исследование термически обработанных модельных образцов, проб пищевой продукции и кормов для животных из торговых

сетей, в том числе консервированной рыбной продукции. Выявление фрагмента внутреннего контроля VE289 и видоспецифичного фрагмента ДНК лосося атлантического во всех образцах соответствовало ожидаемому результату.

Заключение. Для совершенствования системы контроля качества пищевой продукции и кормов для животных была разработана методика выявления ГМ атлантического лосося линии AquAdvantage методом ПЦР в режиме «реального времени». Методика была утверждена в ФГБУ «ВГНКИ» как пригодная к исследованию продукции из рыбы в переработанном или непереработанном виде, сырья для ее производства на всех этапах переработки; рыбных кулинарных изделий, рыбных полуфабрикатов; консервированной продукции из рыбы (кроме паштетов), кормов животного происхождения (кроме паштетов). Планируется использование методики в рамках программ государственного мониторинга безопасности пищевых продуктов и кормов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВА ОБРАЗЦОВ КОФЕ В АСПЕКТЕ СООТВЕТСТВИЯ СОДЕРЖАНИЯ КОФЕИНА ЗАЯВЛЕННОМУ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ

Кузьменко Л.В.^{1,2}, **Шанский Я.Д.**¹, **Беспярых Ю.А.**^{1,2}

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Центр молекулярной медицины и диагностики, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Москва, Россия

Введение. Алкалоиды пуринового ряда (кофеин — 1,3,7-триметилксантин, теofilлин — 1,3-диметилксантин, и теобромин — 3,7-диметилксантин), содержащиеся в бобах кофейного дерева, оказывают бодрящий эффект. Последнее обуславливает употребление кофеин содержащих продуктов в пищу. При этом, малое содержание кофеина в продукте (менее 150 мг в порции) может приводить к тому, что необходимый эффект не будет достигнут, в то время как чрезмерное употребление (более 450 мг/сутки) приведет к эффекту ажитации либо угнетенности, бессоннице, головной боли, физической слабости, тремору и психической неустойчивости [1-3].

Актуальность. Актуальным является проведение качественного и количественного анализа содержания данных веществ в пищевых продуктах с целью проверки соответствия заявленной производителем концентрации кофеина действительной. В данных целях используют метод йодометрического титрования, фотоколориметрии, спектрофотометрии, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС [1,2].

Цель и задачи. Сравнение методов количественного определения содержания кофеина в пищевом продукте — кофе различных сортов: молотом и гранулированном растворимом с использованием различных методов детекции кофеина. Сопоставление экспериментальных данных с маркировкой производителя.

Материалы и методы. Готовый кофейный продукт получали растворением 6 г гранулированного кофе в 300 мл воды или 3 г молотого кофе растворяли в 50 мл воды. Для исследования были отобраны следующие образцы

молотого кофе: Gevalia medium (США); Egoiste Truffle (Нидерланды); Жокей классический (Россия); Brown Weasel Company Robusta (Вьетнам); Царское Подворье десертный кофе «Сливочное печенье»; гранулированного растворимого Nescafe Gold (Россия).

Анализ кофеина проводили тремя методами: 1) ВЭЖХ-УФ по [1] с модификациями; 2) ВЭЖХ-МС по [3] с модификациями; 3) фотометрический согласно ГОСТ 29148-97 [4].

При использовании ВЭЖХ-УФ пробоподготовку образцов кофе проводили путем смешивания 10 мкл раствора образца с 490 мкл ацетонитрила (LiChrosolv, Германия) и 490 мкл воды I класса (LiChrosolv, Германия), после чего смесь центрифугировали и переносили супернатант в вials. Разделение осуществляли с помощью хроматографа Accela (ThermoFisher Scientific, США) на колонке Hypersil ODS C18 (ThermoFisher Scientific, США). Подвижная фаза — градиентная смесь воды и ацетонитрила. Детекцию проводили на УФ-детекторе (λ_{max} 273 нм). Количественный анализ осуществляли методом внешнего стандарта (концентрации стандартных растворов: 0,05, 0,1, 1,0, 10,0 и 100,0 мкг/мл).

Детектирование также проводили с помощью трехкварупольного масс-спектрометра LXQ (ThermoFisher Scientific, США) в режиме обнаружения положительно заряженных ионов. Метод ионизации — электроспрейный. Газ-носитель — гелий; оболочечный и защитный газ — азот. Количественный анализ осуществляли методом внешнего стандарта (концентрации стандартных растворов: 0,005, 0,05, 0,5, 5,0 и 10,0 мкг/мл).

Для проведения фотометрического анализа проводили пробоподготовку согласно ГОСТ 29148-97 [4]. Оптическую плотность измеряли при λ_{max} 492 нм на фотометре Allsheng ARM100 (Китай).

Основные результаты. Данные измерения содержания кофеина в исследованных образцах кофе представлены в таблице.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КОФЕИНА В ОБРАЗЦАХ КОФЕ (НА 1 Г ПРОДУКТА)

Образец	Заявленное производителем содержание, мкг/г	Измеренная концентрация, мкг/г		
		СФ	ВЭЖХ-УФ	ВЭЖХ-МС
Арабика Gevalia medium	320	123,14	н/о	–
Арабика Egoiste Truffle	346,67	142,73	39,59	–
Арабика «Жокей» классический	306,67	156,72	н/о	–
Робуста Brown Weasel Company Robusta	–	138,53	6,24	–
Арабика, робуста Царское Подворье десертный кофе «Сливочное печенье»	333,33	–	–	2178,67
Арабика Nescafe Gold гранулированный растворимый	146,67	–	–	886

Можно видеть, что наибольшее содержание кофеина (39,59 мкг/г исходного продукта) наблюдается для сорта кофе Egoiste Truffle (Нидерланды). Метод фотометрии показывал наиболее высокую концентрацию кофеина, в отличие от ВЭЖХ-УФ.

Выводы. Согласно полученным данным концентрация кофеина была примерно в 2 раза ниже заявленной производителем во всех образцах кофе кроме "Сливочное печенье". Пониженное содержание кофеина в образце робусты может свидетельствовать о присутствии в продукте примесей сорта арабики или о деградации кофеина в процессе хранения, так как сорт робуста превышает арабику по количеству кофеина в 4 раза. Метод ВЭЖХ-МС обеспечивает наибольшую чувствительность и точность измерения, позволяя определять следовые количества кофеина, в отличие от фотометрического, при котором определяются и другие ксантины.

Список литературы:

1. Mendes, V.M., Coelho M., Tomé A.R., Cunha R.A., and Manadas B.. 2019. "Validation of an LC-MS/MS Method for the Quantification of Caffeine and Theobromine Using Non-

Matched Matrix Calibration Curve" // *Molecules* 24, no. 16: 2863. <https://doi.org/10.3390/molecules24162863>

2. Пилипенко, В.П. Сравнительная характеристика методов определения кофеина / В.П. Пилипенко, О.В. Бибик, Н.И. Прихода // *Вопросы химии и химической технологии* — 2009. — №2. — С. 89-91

3. Lopez-Sanchez R., Lara-Diaz V., Aranda-Gutierrez A., Martinez-Cardona J., Hernandez J. «HPLC Method for Quantification of Caffeine and Its Three Major Metabolites in Human Plasma Using Fecal Bovine Serum Matrix to Evaluate Prenatal Drug Exposure» // *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2018, Article ID 2085059, 11 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2085059>

4. ГОСТ 29148-97. Кофе натуральный растворимый. Технические условия : межгосударственный стандарт : дата введения 1999-01-01 / Минск.; 1997. — 36 с.

ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДОВ *BOS TAURUS* И *BOS GRUNNIENS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SNP – БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Кипень В.Н.¹, Исакова Ж.Т.²

¹ Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

² Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и медицины, Бишкек, Кыргызская Республика

Введение. Представители домашнего крупного рогатого скота (*Bos taurus*) и одомашненного яка (*Bos grunniens*) способны свободно скрещиваться, что используют селекционеры и заводчики в своей практике. Однако перед скрещиванием особей данных видов необходимо убедиться в их генетической чистоте и отсутствии неспе-

цифических для вида аллелей. Выявление и документирование недавно гибридных животных (в пределах трех поколений) также может иметь важное значение для сохранения подлинной зародышевой плазмы *Bos grunniens* при воспроизводстве здоровых и генетически разнообразных животных.

По сравнению с КРС яки более полно используют низкорослые пастбищные корма. Мясо яков по всем показателям не уступает говядине и богато белками, а также важными для человека микроэлементами. Стоимость продукции из диетического мяса выше, чем от КРС, что может являться подоплекой для фальсификации продукции. В этом связи задача по дифференциации с использованием методов молекулярной генетики биологических образцов крупного рогатого скота (*Bos taurus*) и одомашненного яка (*Bos grunniens*) стоит весьма остро.

Цель и задачи. С использованием методов биоинформатики провести поиск и анализ SNP с высоким дифференцирующим потенциалом для различения особей биологических видов *Bos taurus* и *Bos grunniens*.

Материалы и методы. Для биоинформатического анализа были использованы геномы животных, представленные в открытом доступе в формате SRA (Sequence Read Archive), которые дополнительно конвертировали в формат *.fasta с использованием пакета SRA-Toolkit v.2.11. Для автоматизации процесса поиска нуклеотидных последовательностей *in silico*, фланкирующих искомым аллель,

использовали скрипт, написанный на языке программирования Python v.3.10, в среде разработки программного обеспечения Jupyter Notebook. В результате биоинформатического анализа SRA файлов из проектов PRJNA217895, PRJNA285834, PRJNA74739, PRJNA508864, PRJNA531398, PRJNA431934, PRJNA762180 проведено определение генотипа *in silico* для 680 SNP. Рассчитаны частоты распространенности генотипов и аллелей в двух выборках («BT» — *Bos taurus* [n=60], «BG» — *Bos grunniens* [n=56]). На основании этих значений рассчитан ABS — интегральный показатель информативности локуса для дифференциации.

Основные результаты. Выявлено 30 SNP с высоким дифференцирующим потенциалом. SNP располагались хромосомах 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 21, 22 и 24. Для SNP Crh.3:88822464A<G, Chr.1:19588119T>C и Chr.17:6739986T>C рассчитанные значения ABS составили 0%, т.е. видоспецифичность составила 100%. Для остальных SNP это значение было больше, для 17 из них значение ABS оказалось <10,0%. В будущем предстоит расширить выборки «BT» и «BG», а также актуализировать приведенные расчеты. Полученные результаты суммированы в таблице.

SNP*	Хромосомная позиция**	ABS, (BT — BG), %	Разница между частотой аллелей A и B, %	
			BT	BG
SNP_629	3:88822464	0,00	100,00	100,00
SNP_012	1:19588119	0,00	100,00	100,00
SNP_262	17:6739986	0,00	100,00	100,00
SNP_568	3:16791106	0,17	95,92	95,74
SNP_235	16:17629545	0,40	98,18	97,78
SNP_667	4:68617701	1,58	93,88	95,45
SNP_614	3:72867068	1,76	88,24	90,00
SNP_622	3:88789019	1,82	98,18	100,00
SNP_389	2:108679611	1,85	98,15	100,00
SNP_028	1:106766777	1,92	98,08	100,00
SNP_561	3:16755989	2,00	98,00	100,00
SNP_675	4:97171136	2,00	98,00	100,00
SNP_474	24:62499788	2,04	97,96	100,00
SNP_813	8:105586695	2,13	97,87	100,00
SNP_458	22:40868779	2,50	100,00	97,50
SNP_168	13:36447379	3,85	96,15	100,00
SNP_073	11:34586181	3,92	96,08	100,00
SNP_052	10:72323390	3,99	94,23	90,24
SNP_600	3:55890949	4,35	100,00	95,65
SNP_632	4:6734049	7,55	92,45	100,00
SNP_798	7:106173693	11,76	88,24	100,00
SNP_475	24:62504661	12,50	87,50	100,00
SNP_846	9:96036861	14,89	85,11	100,00

SNP_123	12:38901818	18,52	81,48	100,00
SNP_016	1:19603024	21,38	93,88	72,50
SNP_652	4:59962174	24,44	75,56	100,00
SNP_430	21:35385652	30,23	69,77	100,00
SNP_678	4:97185364	37,50	62,50	100,00
SNP_361	2:51825396	37,78	62,22	100,00
SNP_058	10:72339726	40,91	59,09	100,00

*собственный код SNP

**Bos_taurus_UMD_3.1.1 (GCF_000003055.6)

Заключение. Выявлено 30 SNP с высоким дифференцирующим потенциалом для различения особей биологических видов *Bos taurus* и *Bos grunniens*. Информативность некоторых SNP предстоит проверить

на выборке биологических образцов из Беларуси и Киргизии.

Биоинформатический анализ выполнен в рамках НИР Б23-060 (БРФФИ, 2023-2025 гг.)

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕКЛОФЕНОКСАТА МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ НА МОДЕЛИ КОРОТКОЖИВУЩИХ РЫБ *N. GUENTHERI*

Бахтогаримов И.Р.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия

Актуальность. Одним из стандартных методов изучения негативного воздействия химического вещества на геном является анализ ДНК-комет (comet assay). Анализ ДНК-комет позволяет идентифицировать разрывы геномной ДНК, возникающие под действием токсинов. Сущность метода заключается в лизировании тканей детергентом с высоким содержанием солей и помещении образца в агарозу на предметное стекло. Под действием электрофореза при высоком уровне pH ядра клеток образуют так называемые «кометы», которые можно наблюдать при помощи флуоресцентной микроскопии. Интенсивность визуализации «хвоста» кометы по отношению к «голове» отражает количество разрывов ДНК. Тест успешно применяется для оценки токсичности веществ на многих эукариотах, в том числе низших позвоночных. Наиболее распространённым модельным объектом для изучения токсических свойств веществ являются рыбы *Danio Rerio*, однако, в настоящее время ведётся активное изучение новых моделей низших позвоночных. Одним из перспективных модельных объектов, совмещающих генетическое родство с человеком, комплекс экономических преимуществ, а также возможность изучения сложных моделей поведения являются рыбы *Nothobranchius guentheri*. Небольшой размер, незначительная продолжительность жизни и возможность содержания в лабораторных условиях позволяют успешно использовать *N. guentheri* для изучения влияния различных веществ на молекулярные механизмы живых организмов. Нотобранхиусы и Данио имеют ряд общих преимуществ: легкое размножение в неволе, простота в содержании, а также компактные размеры. Однако, нотобранхиусов отличает наличие более сложных паттернов поведения, что позво-

ляет использовать их в комплексных экспериментах, включающих не только изучение генотоксичности, но и оценку поведения, что особенно полезно оценивать при изучении препаратов, оказывающих влияние на нервную систему и интеллект. Для отработки метода изучения генотоксических свойств веществ методом ДНК-комет на модели *N. guentheri* был выбран препарат меклофеноксат (диметиламиноэтил 4-хлорфеноксиацетат). Меклофеноксат — это промышленно получаемый сложный эфир диметиламиноэтанола, представляющий собой белый кристаллический порошок, легко растворимый в воде и спирте.

Цель исследования — провести токсические исследования меклофеноксата методом ДНК-комет на рыбах *N. guentheri*.

Материалы и методы. Рыб контрольной и экспериментальной групп (по 5 особей в каждой) кормили агарозой, содержащей меклофеноксат в дозировке 100 мг/кг в течение 14 дней. Для исследования выбрали самок, что связано с их большим адаптационным потенциалом. Таким образом, при использовании тех же концентраций вещества, в случае отсутствия токсического эффекта у самок, можно предполагать аналогичный результат у самцов. Исследование и подготовку рыб проводили в соответствии с международными рекомендациями OECD (Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay). Перед вскрытием рыб анестезировали, помещая на 2 минуты в 0,025% раствор трикаин метансульфоната, также известного как MS-222. Рыб препарировали, органы мишени: печень, мозг и предпочки помещали в пробирки с раствором фосфатно-солевого буфера. После окончания лизиса микропрепараты переносили в камеру для электрофореза и инкубировали в течение 20 мин для

реализации щелочно-лабильных сайтов и щелочной денатурации ДНК. Далее проводили электрофорез в течение 20 мин при потенциале. Для окраски ДНК использовали акридиновый оранжевый. Визуализацию ДНК-комет проводили с помощью универсального микроскопа Zeiss AxioPlan 2 Imaging в флуоресцентном режиме. Обработку фотографий и анализ ДНК-«комет» проводили при помощи программы CometScore v. 1.5. Фотографировали 100 случайным образом отобранных «комет» от каждого образца ткани при увеличении $\times 400$. Для каждой кометы рассчитывали параметры длины хвоста (мкм) и доли ДНК в хвосте (%), после чего посредством произведения данных параметром находили значение момент хвоста. Затем рассчитывали значение медианы (M) и средней ошибки (SE) момента хвоста для каждой группы. Проверка на нормальность распределения

данных, полученных методом Comet Asssay, проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка; поскольку распределение данных не соответствовало нормальному, в качестве критерия достоверности применялся непараметрический критерий Манна-Уитни. За достоверный уровень значимости принимался $p \leq 0,05$. Статистическая обработка данных проводилась в программе SPSS Statistics v.25.

Основные результаты. Результат статистического анализа показал отсутствие значимых различий в значениях момента хвоста ДНК в клетках тканей предпочек, печени и мозга между экспериментальной и контрольной группами, что можно расценивать, как генотоксическую безопасность перорального приема меклофеноксата рыбами *Nothobranchius guentheri* в дозировке 100 мг/кг в день в течение 14 дней.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК В КЛЕТКАХ ОРГАНОВ САМОК *N. GUENTHERI* КОНТРОЛЬНОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГРУПП

Орган	Значение момента хвоста ДНК* (M, SE)	
	Меклофеноксат	Контроль
печень	9,26 [6,94-11,58]	10,23 [8,91-11,55]
мозг	6,00 [5,54-6,46]	5,41 [4,21-6,61]
предпочка	7,19 [4,14-10,24]	5,53 [4,76-6,30]

Выводы. Нами был успешно апробирован способ применения рыб *Nothobranchius guentheri* для изучения токсических свойств веществ методом ДНК-комет. Было выявлено, что использование меклофеноксата в дозировке 100 мг/кг в день на рыбах *N. guentheri* в течение

14 дней не оказывает генотоксического эффекта, что позволяет исследовать иные свойства меклофеноксата на рыбах. Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Геном» ИМБ РАН (https://www.eimb.ru/ru/1/ckp/ccu_genome_c.php).

SNP DIFFERENTIATION POTENTIAL FOR YORKSHIRE PIGS

Snytkov E.V., Kipen V.N., Mikhailova M.E., Sheyko R.I.

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Introduction. The yorkshire pig breed was bred in England in the county of York in the middle of the 19th century. Modern yorkshire breeds are very muscular, with a high proportion of lean meat and little back fat, and are also very strong and hardy. However, the yorkshire breed is known mainly for its extremely developed maternal qualities, which gave it the nickname "Mother Breed". Not only do they farrow and grow large offspring, but they are also excellent milkers. These qualities combine to make them very popular with breeders as they can raise large groups of pigs quickly.

Purpose of the study. To identify and study SNPs with high differentiating potential to distinguish yorkshire pigs from other breeds present in Belarus.

Materials and methods. For bioinformatics analysis, animal genomes were used, which were publicly available in the SRA (Sequence Read Archive) format, which were additionally converted into the *.fasta format using the SRA-Toolkit v.2.11 package. To automate the process of searching for in silico nucleotide sequences flanking the desired allele, we used the

GenS program written in the Python v.3.10 programming language in the Jupyter Notebook software development environment. The bioinformatic analysis involved 248 individuals of the species *Sus scrofa domesticus* (duroc — 85, landrace — 46, large white — 70, pietrain — 28, yorkshire — 19), the "raw" data of the complete genomes of which are located in the SRA database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>): PRJEB1683 PRJNA260763 PRJNA255085 PRJEB9922 PRJNA309108 PRJNA322309 PRJNA358108 PRJNA343658 0 PRJNA487172 PRJNA506339 PRJNA507853 PRJNA485589 PRJNA488960 PRJEB30282 PRJNA520978, PRJNA622908, PRJNA626370, PRJNA671763, PRJNA712489.

DNA samples of 142 domestic pigs of five breeds bred in the Republic of Belarus (duroc, landrace, yorkshire, belarusian large white, belarusian meat) served as biological material for molecular genetic research. The prevalence frequencies of genotypes and alleles were calculated. SNP differentiating potential was determined using ROC analysis in SPSS v.20.0.

Results. ROC analysis results for SNP AX-116690009 (target breed according to bioinformatics analysis conducted in 2022 [1]. — duroc), AX-116346555 (duroc), AX-116519407 (duroc), AX-116735790 (large white), AX-116218162 (large white), AX-116298633 (landrace), AX-116379068 (landrace) are presented in the table.

TABLE. DIFFERENTIATING POTENTIAL OF SNP FOR PIGS OF BREED YORKSHIRE (BASED ON ROC ANALYSIS ACCORDING TO KASP)

SNP	AUC	p-level	95% CI	
			Lower limit	Upper limit
AX-116690009	0.651	<0.0001	0.587	0.715
AX-116346555	0.727	<0.0001	0.668	0.787
AX-116519407	0.454	0.231	0.383	0.526
AX-116735790	0.361	<0.0001	0.293	0.428
AX-116218162	0.641	<0.0001	0.566	0.715
AX-116298633	0.466	0.373	0.392	0.540
AX-116379068	0.646	<0.0001	0.578	0.714

Based on the results presented in the table, the greatest differentiating potential (both through confirmatory alleles, i.e. specific to JO, and through exclusion alleles, i.e. specific to other breeds in the study) to distinguish between the Yorkshire from other breeds, namely: landrace, duroc, belarusian meat or belarusian large white — turned out to be SNP AX-116690009, AX-116346555, AX-116735790, AX-116218162 and AX-116379068.

In yorkshires, for SNP AX-116690009, the A allele frequency was 2.6%, the G allele frequency was 97.4%; AX-116346555 the G allele frequency was 10.4%, the T allele frequency was 89.6%; AX-116735790 allele frequency A — 80.5%, allele frequency G — 19.5%; AX-116218162 C allele frequency — 61%, G allele frequency — 39%; AX-116379068 allele frequency A — 33.8%, allele frequency G — 66.2%.

Conclusion. Thus, for the first time in Belarus, the differentiating potential of SNP AX-116690009, AX-116346555,

AX-116735790, AX-116218162 and AX-116379068 for distinguishing biological samples belonging to the yorkshire breed from other breeds of pigs was shown for the first time in Belarus. In the future, it is planned to expand research in this area: increase the samples and conduct a joint analysis of several SNPs to develop a differentiation model.

The study was carried out within the framework of GPNI «Biotekhnologii-2», podprogramma «Genomika, epigenomika, bioinformatika» na 2021-2025 gg., zadanie «Razrabotka sistemy geneticheskogo analiza dlya opredeleniya chistoporodnosti svinej na osnove izucheniya SNP-lokusov» (2021-2023)

References:

1. Analysis of KDM3A and DBX2 gene polymorphism for differentiation of *Sus scrofa domestica* duroc pigs / V.N. Kipen, M.E. Mikhailova, E.V. Snytkov, R.I. Sheyko // Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus, 2023; 267:119; DOI: 10.29235/1561-8323-2023-67-2-119-125

Раздел 23. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ

ГИДРОФОБИНЫ И ГЛУТАРЕДОКСИНЫ АСПЕРГИЛЛОВ, КАК МАРКЕРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ, ДОСТУПНЫЕ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОБНАРУЖЕНИЯ

Рябинин И.А., Васильева Н.В.

ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России (кафедра медицинской микробиологии, НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина), Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Микромицеты рода *Aspergillus* известны, как возбудители различных патологий преимущественно органов дыхания, но встречаются и экстрапульмональные инфекции, связанные с этими грибами. Значимость этих возбудителей в глобальном здравоохранении существенно выросла за период пандемии новой коронавирусной инфекции в связи с появлением особой нозоформы — COVID-19-ассоциированный инвазивный аспергиллез. В клиническом течении одного и того же типа аспергиллеза легких у различных пациентов наблюдаются существенные отличия, так, хронический аспергиллез легких может протекать, как простая аспергиллема, не сопровождающаяся прогрессией и явной клиникой месяца и даже годы, но встречаются и случаи манифестного хронического кавернозного аспергиллеза легких, проявляющегося грубыми изменениями в легочной паренхиме, перестройкой сосудистого русла. Причины таких различий могут быть обусловлены как особенностями течения фонового заболевания, так и вирулентностью конкретного штамма возбудителя. В этом ракурсе представляется целесообразной разработка средств выявления факторов вирулентности *Aspergillus* spp., доступных для использования в диагностической деятельности микробиолога. Определенные перспективы в этом направлении открывает анализ результатов MALDI-TOF-масс-спектрометрии, все чаще используемой отечественными лабораториями.

Цель исследования — определить наличие и особенности сигналов от белковых факторов вирулентности в MALDI-масс-спектрах возбудителей аспергиллеза и спрогнозировать практическое значение их экспресс-обнаружения.

Материалы и методы. Проведен анализ ранее полученных аннотаций MALDI-масс-спектров из белковых экстрактов культур *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. clavatus*, *A. terreus* и *A. nidulans* на предмет наличия пиков, соответствующих доказанным и потенциальным факторам вирулентности грибов рода *Aspergillus*. Аннотации были получены путем биоинформационного анализа, как описано ранее [Рябинин И.А., Чернец Е.Н., Васильева Н.В., 2019] на модельных штаммах, при работе с которыми удалось получить MALDI-масс-спектры наиболее высокого качества съемки среди других изученных штаммов данных видов. Для выявленных факторов вирулентности выкопировали значения m/z пиков, по этим значениям произвели поиск

соответствий у других изученных штаммов из Российской коллекции патогенных грибов и собственной рабочей коллекции путем группового наложения масс-спектров во flexAnalysis 3.4.

Результаты. В MALDI-масс-спектрах изученных видов *Aspergillus* spp. выявлены пики гидрофобинов НурС и НурВ (*A. flavus* и *A. oryzae*), а также глутаредоксина (*A. nidulans* и *A. clavatus*) и гликофосфатидилинозитол-(ГФИ)-заякоренного белка (*A. nidulans*). Референтные значения m/z пиков у модельных штаммов составили для гидрофобина НурС — 8213; гидрофобина НурВ — 12678; глутаредоксина Grx1 — 10953; ГФИ-заякоренного белка — 14981. Разнообразие сигнала от ионов гидрофобинов изучили на MALDI-масс-спектрах 39 штаммов *A. flavus* и *A. oryzae*; данные близкородственные виды, сходные по многим признакам, в выборке анализировали совместно, поскольку в диапазоне указанных значений m/z их MALDI-масс-спектры имеют конгруэнтные контуры. По гидрофобину НурС 2 штамма *A. flavus* (5%) не имеют соответствующего пика. Примечательно, что оба штамма отличаются наличием в колониях дополнительного светло-коричневатого пигмента; вероятно, эти два признака в фенотипе *A. flavus* могут быть взаимоисключающими. У 8 штаммов (20%) вблизи референтного значения находятся вершины нескольких пиков с очень малой $\Delta m/z$; нижняя граница интервала, в котором регистрируется целевой сигнал, составила (в формате $M \pm 2\sigma$) $8205,25 \pm 4,24$, верхняя — $8206,88 \pm 4,84$. Прочие штаммы (29, 75%) имеют один пик, близкий референтному значению, с m/z $8208,19 \pm 5,68$. По указанным параметрам коэффициент вариации составил 0,03%, что подтверждает высокую однородность изученной выборки по данному признаку. Зафиксированные отклонения, очевидно, связаны не с наличием каких-либо изоформ НурС (ввиду малых $\Delta m/z$), а с особенностями процессов ионизации молекул этого гидрофобина. Характер проявления сигнала гидрофобина НурВ в MALDI-масс-спектрах оказался следующим: у 4-х штаммов пик отсутствует (10%), у 14 штаммов (36%) вблизи референтного значения находятся несколько отчетливых пиков — от 2 до 5, у прочих (21) имеется единственный пик (54%). С учетом дополнительных пиков вблизи референтного значения получили выборку данных по m/z на 52 единицы, так, что характеристика сигнала $12667,27 \pm 36,2$. Сравнительно широкий разброс значений m/z ионов гидрофобина НурВ, а также больший,

чем у НурС коэффициент вариации (0,14%) объясняется особенностями ионизации белков в данном диапазоне при использовании в качестве MALDI-матрицы 4-гидроксикоричной кислоты: удается получить пики сравнительно небольшой интенсивностью и с широким основанием.

У 4-х изученных штаммов *A. nidulans* пик глутаредоксина с близким совпадением прослеживается у одного; примечательно, что в MALDI-масс-спектре культуры *A. nidulans* РКПГ F-1336 вместо пика глутаредоксина в близком диапазоне виден высокоинтенсивный пик с m/z 10886. Штамм *A. clavatus* отличается наличием 2 пиков, предположительно, принадлежащих глутаредоксинам — 10221 и 11127. Пики ГФИ-заякоренного белка обнаружили у двух штаммов *A. nidulans*.

Заключение. Таким образом установлено, что в MALDI-масс-спектрах некоторых видов группы «*Aspergillus non-fumigatus*» присутствуют белки, опосредующие патогенное действие. Наиболее отчетливо оказались представлены гидрофобины и в меньшей степени — глутаредоксина. «Избирательный» результат выявления этих факторов в отношении видового разнообразия, в том числе отсутствие в масс-спектрах наиболее известного возбудителя — *A. fumigatus*, можно объяснить конкурентным взаимодействием белков при протонировании матрицей, а также экранированием сигнала от них другими spectroобразующими молекулами. Данные группы

белков являются синергидными по эффекту, проявляя антифагоцитарную активность: гидрофобины скрывают молекулярные «паттерны» на поверхности конидий аспергиллов. Эти белки — наиболее поверхностный слой конидий, упорный к действию активных форм кислорода и ферментов. Глутаредоксина входят в антиоксидантную систему *Aspergillus* spp. и способствуют выживанию их клеток на кислород-зависимом этапе фагоцитоза. Для детального выяснения значимости масс-спектрометрического обнаружения этих белков в дальнейшем целесообразно проводить параллельную с их детекцией оценку показателей фагоцитоза у больных различными инфекциями, обусловленными *Aspergillus* spp., с использованием в качестве фагоцитируемых частиц конидий из аутоштаммов тех же пациентов.

Авторы выражают благодарность заведующей Российской коллекцией патогенных грибов Г.А. Чилиной и заведующей НИЛ микологического мониторинга и биологии грибов Т.С. Богомоловой за предоставление штаммов *Aspergillus* spp. для исследования.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минздрава России «Молекулярно-генетические и иммунологические аспекты микозов легких, вызванных грибами рода *Aspergillus*. Фокус на адаптивный иммунный ответ и механизмы иммунной толерантности» № НИОКТР 122012100294-4.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НЕЙРОИНФЕКЦИЙ ПРИ ПОРАЖЕНИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Шахгильдян В.И.¹, Домонова Э.А.¹, Ядрихинская М.С.², Орловский А.А.³, Канестри В.Г.¹, Тишкевич О.А.⁴, Яровая Е.Б.³

¹ ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (ЦНИИЭ), Москва, Россия;

² Московский городской Центр по профилактике и борьбе со СПИДом (МГЦ СПИД), Москва, Россия;

³ ФГБОУ «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (МГУ им. М.В. Ломоносова), Москва, Россия;

⁴ Клиническая инфекционная больница № 2 Департамента здравоохранения города Москвы (КИБ №2 ДЗМ), Москва, Россия

Актуальность. Проблема тяжелых поражений ЦНС, обусловленных ВИЧ и вторичными заболеваниями у больных ВИЧ-инфекцией сохраняет актуальность.

Цель. Установление спектра поражений ЦНС, частоты выявления и количественных характеристик ДНК возбудителей нейроинфекций и РНК ВИЧ в СМЖ, определение диагностического значения наличия и различных концентраций ДНК патогенов в СМЖ, крови для верификации природы энцефалита у больных ВИЧ-инфекцией.

Материалы и методы. Обследованы 5485 стационарных больных ВИЧ-инфекцией, 3333 — на стадии СПИДа, 1310 с поражением ЦНС. Для качественного или количественного определения нуклеиновых кислот (НК) возбудителей вторичных заболеваний, протекающих с поражением ЦНС, и ВИЧ в образцах СМЖ (n=1667) использовали ПЦР-РВ, ОТ-ПЦР-РВ. Экстракцию НК проводи-

ли с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Исследовали 743 образцов сыворотки крови и 3623 образцов плазмы крови с количественным определением ДНК ЦМВ. Постановку ПЦР-РВ, ОТ-ПЦР-РВ осуществляли с использованием наборов реагентов производства ЦНИИЭ на приборе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» «Rotor-Gene Q» («Qiagen GmbH», Германия). Применяли пакеты статистических программ Statistica v. 10.0 и SPSS v. 20, язык программирования R. Взаимосвязи исследовали с помощью анализа таблиц сопряженности с применением критерия χ^2 Пирсона. Поиск ассоциаций количества копий ДНК ЦМВ в биоматериале пациента и наличия ЦМВ-энцефалита проводили с применением ROC-анализа. Уровень значимости для проверяемых статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты. Поражение ЦНС диагностировано у 23,8% больных ВИЧ-инфекцией, 39,3% пациентов на стадии СПИДа, 62,7% среди умерших лиц. Структура заболеваний ЦНС: церебральный токсоплазмоз 275 случаев (12,1% из числа больных с поражением ЦНС, 8,3% из числа больных на стадии СПИДа), туберкулезный менингит 90 (6,9% и 2,7%), криптококковый менингит 78 (6% и 2,3%), ВИЧ-энцефалит 54 (4,1% и 1,6%), лимфома ЦНС 33 (2,5% и 1%), ЦМВ-энцефалит 28 (2,1% и 0,8%), ПМЛ 21 (2% и 0,6%), кандидозный менингит 15 (1,1% и 0,5%), ВВЗ-энцефалит 10 (0,8% и 0,3%), нейросифилис 7 (0,5% и 0,2%), ВГЧ-6А/В-энцефалит 5 (0,4% и 0,2%), ВПГ-1 энцефалит 2 (0,2% и 0,1%). У 704 больных (53,7%) природа патологии ЦНС установлена. Манифестная ЦМВИ — 448 сл. (13,4% больных на стадии СПИДа). ЦМВ-энцефалит (28) диагностирован у 4,8% из 584 пациентов с установленной этиологией поражения ЦНС, у 6,3% лиц с клинически выраженной ЦМВИ.

Концентрация РНК ВИЧ в плазме крови: 0 — 22 794 770 копий/мл (Ме 143203, [14 643–608 946] копий/мл). ВН > 100 000 копий/мл — 55,7% сл., из них >1000000 копий/мл — 26,6%. РНК ВИЧ выявлена в СМЖ в 86,6% случаев. Концентрация РНК ВИЧ СМЖ: 0 — 5 501 576 копий/мл (Ме 10108 [735–63864] копий/мл). ВН > 100000 копий/мл 18,2%, из них > 1 000 000 копий/мл 16,7% сл. Содержание в СМЖ РНК ВИЧ >100 000 копий/мл ассоциировалось с нейрокогнитивными расстройствами средней степени или ВИЧ-энцефалитом. Выявлены статистически значимые связи между количеством РНК ВИЧ в крови и СМЖ, но у 7,5% (7) пациентов концентрация РНК ВИЧ в СМЖ >10 раз концентрации РНК ВИЧ в плазме.

Частота выявления в СМЖ: ДНК ВЭБ 26,7%, *T. gondii* 11,7%, ЦМВ 8,7%, *S. neoformans* 4,6%, *JCPyV* 3,7%, *M. tuberculosis* (МБТ) 3%, ВПГ-1,2 2,4%, ВГЧ-6А/В 1,5%, ВВЗ 1,2%, *S. albicans* 1,9%, *S. glabrata* 1,4%, *S. krusei* 1,0% сл. Отсутствие в СМЖ ДНК ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6А/В, грибов р. *Candida*, *JCPyV*, ВВЗ, РНК ВИЧ исключало наличие поражения ЦНС указанной этиологии с вероятностью 99,2–100%, ДНК МБТ — 98,1%, ДНК *T. gondii* — 95,4%. Наличие в СМЖ ДНК *T. gondii*, ДНК МБТ, ДНК *S. neoformans*, ДНК *JCPyV* имело 100% диагностическую специфичность. Диагностическая специфичность присутствия в СМЖ ДНК ВЭБ составила лишь 2,4%, *S. albicans* — 12,5%, *S. krusei* — 12,5%, *S. albicans* — 15%, ЦМВ — 17,2%, ВГЧ-6 А/В — 25%, РНК ВИЧ — 21,4%. Концентрации ДНК ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6 А/В, грибов р. *Candida* были от единичных до более чем миллиона копий в мл СМЖ.

ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови выявлена в 393 (52,8%) сл. ЦМВ-энцефалит был лишь у 5 (1,3%) больных с наличием ДНК ЦМВ в клетках крови и ни в одном из 738 (0%) сл. при отсутствии вируса. Содержание ДНК ЦМВ: 0,5 до 5,6 Ig копий/10⁵ клеток (Ме 1,8; [1,2 — 2,5] Ig копий/10⁵ клеток).

ДНК ЦМВ в плазме крови выявлена у 623 (7,2%) больных. ЦМВ-энцефалит был у 18 (2,9%) из 623 пациентов с наличием ДНК ЦМВ в плазме крови и 3 (0,2%) больных при отсутствии вируса в биоматериале (1522). Концентрация ДНК ЦМВ в плазме крови: 100 — 10000000 копий/мл (Ме 910; [165 — 4350] копий/мл). Концентрация ДНК ЦМВ в СМЖ: 47 — 4 373 385 копий/мл (Ме 400; [200 — 1400] копий/мл). В СМЖ ДНК ЦМВ отсутствовала в 1522 (91,3%) сл.; выявлена в концентрации < 1000 копий/мл у 100 (6%) сл., 1001 — 10 000 27 (1,6%), 10 001 — 100 000 13 (0,8%), > 100 000 копий/мл — 5 (0,3%) сл.

При ROC-анализе концентраций ДНК ЦМВ и наличия ЦМВ-энцефалита определено, что для отрезного значения количества ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови 4,95 Ig копий/10⁵ клеток, диагностическая специфичность составила 99,2% при чувствительности 20%, для значения 4,65 Ig копий/10⁵ клеток — 98,5% и 40%. Для низкой отрезной точки количества ДНК ЦМВ 1,85 Ig копий/10⁵ клеток диагностическая чувствительность составила 100% при специфичности 55,7%. Для значения концентрации ДНК ЦМВ в плазме крови 352170 копий/мл, специфичность составила 99%, чувствительность — 5,6%; для количества ДНК ЦМВ 62700 копий/мл — 95,9% и 16,7%. Отрезная точка концентрации ДНК ЦМВ в плазме 520 копий/мл имела 100% чувствительность при специфичности 42,6%; 1250 копий/мл — 94,4 и 56,5%. Для отрезного значения концентрации ДНК ЦМВ в образцах СМЖ 28500 копий/мл специфичность составила 100% при чувствительности 50%, для значения 16600 копий/мл — 98,8 и 75%. Для низкой отрезной точки, равной 70 копий/мл, чувствительность составила 100% при специфичности 1,2%, для значения 150 копий/мл — 93,8 и 9,6%.

Выводы. Отсутствие ДНК возбудителя нейроинфекции, РНК ВИЧ в СМЖ в подавляющем большинстве случаев исключает роль в развитии патологии ЦНС у больных ВИЧ-инфекцией. Наличие в СМЖ ДНК *T. gondii*, МБТ, *S. neoformans*, *JCPyV* со 100% вероятностью подтверждает соответствующую этиологию энцефалита/менингита. Качественное обнаружение ДНК ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6, грибов р. *Candida*, РНК ВИЧ в СМЖ не говорит о природе поражения головного мозга. Необходимо их количественное определение. Выявление ДНК ЦМВ в СМЖ в концентрации > 16600 копий/мл, лейкоцитах крови > 4,65 Ig копий/10⁵ клеток, плазме крови > 62700 копий/мл с 95% вероятностью подтверждает ЦМВ-природу поражения головного мозга. Отсутствие ДНК ЦМВ или выявление ДНК вируса в лейкоцитах крови в концентрации < 1,85 Ig копий/10⁵ клеток, плазме крови < 1250 копий/мл, СМЖ < 150 копий/мл с 90% вероятностью исключает наличие ЦМВ-энцефалита и требует продолжения диагностического поиска для установления природы патологии ЦНС.

Раздел 24. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ВОСПРОИЗВОДСТВЕ И ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ В СЕЛЬСКОМ И ЛЕСНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАРКЕРОВ ДНК В ОТСЛЕЖИВАНИИ ПУТЕЙ РАСПРОСТРАНЕНИЯ В РОССИИ ИНВАЗИЙНОЙ ГРУППИРОВКИ УССУРИЙСКИЙ ПОЛИГРАФ – ФИТОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ

Баранчиков Ю.Н.¹, Кононов А.В.², Ефременко А.А.¹, Перцова А.А.¹, Пашенова Н.В.¹

¹ Институт леса им.В.Н.Сукачева СО РАН, Красноярск, Россия

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Уссурийский полиграф *Polygraphus proximus* Bladford (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) является относительно недавним дальневосточным инвайдером в пихтовых лесах и декоративных посадках пихты в Южной Сибири и в Европейской части России. В Красноярском крае самые ранние повреждения пихт полиграфом датированы, по дендрохронологическим данным, началом 1970-х годов. В настоящее время этот вид, совместно с комплексом ассоциированных офиостомовых грибов является одним из главных факторов патологии лесов из пихты *Abies sibirica* Ledeb. в связи с малым прессом со стороны паразитов и отсутствием устойчивости у местной пихты к инвазийному комплексу.

Мы постарались реконструировать историю распространения инвазийного комплекса вредителей пихт при помощи молекулярных методов. Для изучения генетической варибельности были секвенированы последовательности митохондриальных генов COI и COII у 309 жуков полиграфа из 22 популяций, собранных в Японии, на Сахалине, в Хабаровском и Красноярском краях, Томской, Новосибирской и Кемеровской областях, Республиках Хакасия и Алтай, в г. Москве. Для оценки генетической варибельности культур грибов были секвенированы последовательности ДНК-маркёров ITS2 и LSU в 303-х чистых культурах грибов из пяти географических популяций полиграфа, расположенных вдоль Транссиба от Хабаровска до Москвы. На основании идентичности полученных последовательностей с последовательностями из базы данных определяли видовую принадлежность образца. Последовательности анализировали алгоритмом MUSCLE в программе UGENE 1.16, далее производился их филогенетический анализ методом максимального правдоподобия в программе PhyML с использованием aLRT теста для оценки значимости и в программе MrBayes 3.2.5. Для популяционного анализа использовали программу ARLEQUIN v. 3.11.

Анализ объединенных последовательностей COI и COII жуков позволил выявить 18 гаплотипов, принадлежащих, согласно методу максимального правдоподобия, к пяти группам. Гаплотипы четырех из пяти групп присутствовали в дальневосточных популяциях полиграфа, трех групп — в московской популяции, в то время как японской и двум сибирским популяциям принадлежали гаплотипы только одной (но разной) группы. Распределения гаплотипов в начальном и вторичном ареалах полиграфа четко демонстрировали инвазийную природу сибирских и

европейской популяций *P. proximus*. Наборы гаплотипов дальневосточных популяций оказались наиболее изменчивыми и содержали гаплотипы из всех групп, обнаруженных на континенте. Хотя японские популяции и были четко отличны от континентальных, им также была свойственна высокая изменчивость. По контрасту, инвазийные западно-сибирские (Томск, Кемерово, Новосибирск и Алтай) и восточно-сибирская (Красноярск) популяции имели каждый только по два гаплотипа и каждая из этих пар была полностью отличной. При этом три из этих четырех гаплотипов присутствовали на Дальнем Востоке. Все это привело к низкой генетической изменчивости в сибирских популяциях, свойственной обычному при интродукции эффекту «бутылочного горлышка», и позволило предположить, что инвазии в Западную и Восточную Сибирь были независимыми друг от друга.

На запад полиграф пришел по Транссибирской магистрали в вагонах с древесиной или в неокоренных вагонных стойках. Детали локальных распространений могут быть отслежены по особенностям гаплотипов. К примеру, популяции полиграфа на восточном склоне ориентированного по меридиану хребта Кузнецкий Алатау обладают иным, «красноярским» набором гаплотипов, нежели популяции на западном склоне. Изначально, по-видимому, жуки попали на хребет с грузами по ветке Ачинск-Белогорск в начале 1960-х. Затем они самостоятельно продвигались на юг со средней скоростью 2-3 км/год. Жуки с гаплотипами восточно-сибирской группы были недавно найдены близ станций Балыкса и Лужба на железнодорожной ветке Новокузнецк-Абакан.

На территории Восточной Сибири зафиксирована ассоциация *P. proximus* с 8 видами грибов-фитопатогенов. На территории Западной Сибири выявлена ассоциация с 7 видами грибов, а в европейских популяциях только с 4 видами. Согласно проведенному мониторингу симбиотических сообществ, можно отметить, что видовое разнообразие микобиоты *P. proximus* в инвазивных популяциях при движении с востока на запад снижается. Это направление совпадает с направлением расселения данного вредителя. Наблюдается элиминация близкородственных видов, принадлежащих к одному роду, которая согласуется с концепцией конкурентного исключения.

Основываясь на географическом распространении, можно выделить группы видов, которые входят в микро-

биоту жука. Первая группа включает *Grosmannia aoshima*, *Ophiostoma subalpinum*, *Gr. rectangulosporium* и *Geosmithia* spp. Они входят в состав его микобиоты во всех исследованных регионах. Вторая группа включает *Gr. microsporum*, *O. nikkoense* и *O. picea*. Они обнаружены в симбиотическом ансамбле жуков в регионах Сибири и Дальнего Востока. Третья группа видов включает *Gr. piceaperda*, *Leptographium*

taigense и *L. aenigmaticum*. Эти виды обнаружены только на территории Дальнего Востока.

Таким образом, виды грибов *Gr. aoshimae*, *Gr. rectangulosporium* и *O. subalpinum* формируют ядро симбиотического комплекса *P. proximus* на исходной территории, и распространяются совместно с этим короедом в процессе его инвазии на новые территории.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИКОНТАМИНАЦИОННОЙ ПЦР В КАРАНТИННОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Дренова Н. В., Яремко А. Б., Кондратьев М. О.

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР»), Быково, Россия

Введение. Лабораторные тесты на основе ПЦР широко используются в диагностике карантинных вредных организмов (КВО), прежде всего, фитопатогенов. Высокая чувствительность, специфичность, универсальность и производительность метода необходимы при рутинных исследованиях разнородных растительных образцов на выявление широкого спектра возбудителей, зачастую присутствующих в латентном состоянии. Необходимость сокращения времени исследования образцов, в особенности при экспорте и импорте продукции, заставляет исключить из схемы диагностики традиционные микробиологические методы, связанные с культивированием возбудителя и оценкой его патогенности. Серологические методы, часто использовавшиеся ранее для скрининга образцов, часто недостаточно чувствительны и специфичны. Кроме того, доступность сывороток к фитопатогенам достаточно ограничена, а их качество зачастую нестабильно. Таким образом, наиболее применимыми для карантинных лабораторий становятся методики, основанные на комплексе ПЦР-тестов. Однако такой подход к выявлению КВО требует усиления мер по предотвращению ложноположительных реакций, в первую очередь, исключения контаминации ампликонами [1].

Антиконтаминационная ПЦР основана на использовании в реакции dUTP вместо dTTP и предварительной обработке смеси урацил-ДНК-гликозилазой (UDG). Урацилсодержащие ампликоны, занесенные в реакцию, разрушаются ферментом на начальном этапе реакции, после чего UDG дезактивируется при прогревании, что в дальнейшем предотвращает разрушение вновь синтезируемых ампликонов. Метод известен с 90-х годов XX века [2] и в настоящее время в РФ используется, в частности, при диагностике возбудителей болезней животных [3].

Цель исследования — внедрение данного подхода в практику диагностики возбудителей карантинных бактериозов с использованием наборов и оборудования российского производства.

Объект исследования — возбудитель желтой болезни гиацинта *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi* (Wakker) Dowson (*Xanthomonas hyacinthi* (Wakker) Vauterin et al.). Патоген поражает луковичные эфемероиды подсемейства Scilloideae и регулируется карантинными службами ряда

стран Европы, Азии, Африки и Латинской Америки [4]. В ЕАЭС входит в перечень отсутствующих на территории КВО, однако риск его заноса с посадочным материалом в латентном состоянии остается высоким.

Материалы и методы. В исследовании использовали готовую смесь для ампликации в режиме ПЦР-РВ с интеркалирующим красителем производства ООО «Биолабмикс», Новосибирск «BioMaster UDG HS-qPCR SYBR Blue (2x)». Провели оптимизацию и оценку применимости [5] тестов с четырьмя парами оригинальных праймеров Xh5F/R, Xh16F/R, Xh17F/R и Xh22F/R, разработанных к последовательностям генов патогенности *X. hyacinthi*. Для испытаний использовали экстракты луковиц и листьев различных растений-хозяев с добавлением суспензии суточной культуры типового штамма *X. hyacinthi* CFBP1156 в известной концентрации. Аналитическую специфичность (АС) определяли с использованием 6 штаммов *X. hyacinthi*, 50 штаммов других видов р. *Xanthomonas* и более 100 изолятов, ассоциированных с растениями-хозяевами возбудителя. С помощью оптимизированных тестов исследовали образцы луковиц и надземных частей искусственно зараженных растений-хозяев для определения диагностических критериев тестов. Для выделения тотальной ДНК из растительных экстрактов использовали набор «Проба ГС» (ООО «Агродиагностика», Москва). Тесты проводили в моно — и мультиплексном формате с внутренним контролем (ВК) с праймерами COX F/R к гену цитохромоксидазы растений [6]. Реакцию проводили на детектирующих амплификаторах серии «ДТ» (ЗАО «НПФ «ДНК-Технология», Москва) и «CFX96» («BioRad», США) в объеме 25 мкл с использованием 8 пмоль каждого праймера, 4 пмоль праймеров ВК и 5 мкл ДНК в 2- и 3-этапном формате с финальным плавлением продуктов реакции после 40 циклов амплификации. Наличие характерных продуктов контролировали методом электрофореза в агарозном геле.

Дополнительно проверили антиконтаминационную эффективность реакционной смеси, используя в качестве матрицы ампликоны, полученные в предыдущих реакциях. Опыт проводили с предварительным этапом инкубирования в течение 2 мин при 50°C, рекомендованным производителем набора и без него, а также с использованием ампликонов, полученных с обычными реакционными смесями без dUTP.

Основные результаты. В ходе проверки антиконтаминационной эффективности набора для ПЦР было показано снижение значений порогового цикла (Ct) с 8-10 до 37-38 при использовании рекомендаций производителя. Образование небольшого количества продукта соответствует реакции единичных копий и может объясняться присутствием остатков хромосомной ДНК возбудителя, не содержащих урацил.

Рабочие критерии тестов для выявления ДНК *X. hyacinthi* в растительном экстракте составили: аналитическая чувствительность 10^2 — 10^3 КОЕ/мл, аналитическая специфичность — 100%, повторяемость и воспроизводимость — 90-100% для тестов с праймерами Xh16F/R, Xh17F/R, Xh22F/R и 70% для тестов с праймерами Xh5F/R, образующих более длинный продукт. Селективность проявлялась при недостаточно тщательном удалении из экстракта хлорофилла или крахмала. Диагностическая специфичность и чувствительность тестов с использованием искусственно зараженного материала также была близка к 100% в сравнении с аналогичными стандартными тестами с использованием обычных реакционных смесей.

Заключение. Апробирована коммерческая реакционная смесь российского производства для ПЦР-РВ с интеркалирующим красителем на основе использования dUTP и N-урацил-ДНК-гликозилазы. Показаны высокие значения рабочих критериев и антиконтаминационная эффек-

тивность тестов с использованием данного набора. Тесты включены в методические рекомендации по диагностике *X. c. pv. hyacinthi* для лабораторий Россельхознадзора. Внедрение антиконтаминационной ПЦР в практику карантинных лабораторий необходимо при использовании надежных диагностических схем, основанных на комплексе ПЦР-тестов без последующего выделения культуры возбудителя.

Исследование проведено в рамках Государственного задания по теме: «Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя желтой болезни гиацинта *Xanthomonas campestris pv. hyacinthi* (Wakker) Dowson (*Xanthomonas hyacinthi* (Wakker) Vauterin et al.), регистрационный № НИОКТР 122041300085-6.

1. Дренова Н. В., Джалилов Ф. С. (2021). DOI 10.37747/2312-640X-2021-19-227-229.

2. Longo et al (1990). DOI: 10.1016/0378-1119(90)90145-h. PMID: 2227421.

3. Замотаева Т.Л. и др. (2016). URL: <https://applied-research.ru/article/view?id=9019>.

4. [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://gd.eppo.int/taxon/XANTHY>

5. EPPO/OEPP Standard PM 7/98 (2). <https://doi.org/10.1111/epp.12118>.

6. Weller et al (2000). DOI: 10.1128/AEM.66.7.2853-2858.2000.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ *FUSARIUM SAMBUCINUM*, ИНДУЦИРУЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ ПШЕНИЦЫ И ТОМАТА К ФУЗАРИОЗАМ, С ПОМОЩЬЮ ТРАНСКРИПТОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ И ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Щербакова Л.А.¹, Одинцова Т.И.², Слезина М.П.², Истомина Е.А.²

¹ ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии (ВНИИФ), Московская область, Большие Вязёмы, Россия;

² ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН), Москва, Россия

Введение. Одним из наиболее современных и интенсивно развивающихся направлений в области защиты сельскохозяйственных культур от болезней является активация защитных механизмов растений различными биогенными небиоцидными экологически безопасными соединениями, в том числе микробными элиситорами, индуцирующими неспецифическую системную устойчивость к фитоптогенам. Ранее мы показали, что белки-элиситоры, продуцируемые непатогенным штаммом FS-94 микромицета *Fusarium sambucinum*, способны индуцировать системную приобретенную устойчивость (SAR) к возбудителям фузариоза колоса, корневой гнили пшеницы и фузариозного вилта томата, активируя целый ряд неспецифических защитных ответов растений [1-3].

Целью данной работы было исследование влияния указанных элиситоров на экспрессию генов, кодирующих у растений пшеницы (*Triticum kiharae*) и томата (*Solanum lycopersicum*) дефензины, сигнальные пептиды, а также белки-маркеры SAR с помощью глубокого секвенирова-

ния транскриптома (RNA-seq) этих растений и ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы. Тотальную РНК выделяли из 100-150 мг растительного материала с помощью набора Plant RNA Isolation Aid (для *T. kiharae*) или набора ExtractRNA (для *S. lycopersicum*) согласно протоколам производителей. Качество образцов РНК проверяли с помощью NanoDrop 2000 и биоанализатора Agilent 2100. Половину каждого образца РНК использовали для получения 4 (*T. kiharae*) или 10 (*S. lycopersicum*) библиотек кДНК для секвенирования на Illumina HiSeq2500 (*T. kiharae*) или Illumina HiSeq4000 (*S. lycopersicum*); а оставшуюся половину образцов — для проверки экспрессии отдельных генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Оценку качества сборки транскриптома выполняли с помощью программы BUSCO (версия 1.2). Биоинформационный анализ в случае *T. kiharae* проводили, сопоставляя собранные контиги с набором *T. aestivum*, используя алгоритм BLAST (версия 2.2.25+) с параметром e-value = 1×10^{-6} ; для не аннотируемых с помощью BLAST

контигов применяли GeneMarkST-T (параметры по умолчанию). При биоинформационной обработке данных анализа транскриптома *S. lycopersicum* использовали программное обеспечение STAR версии 2.5.1b с параметром «-quantMode GeneCounts». Для оценки дифференциально экспрессируемых генов (DEG) подсчет ридов проводили с помощью программного обеспечения DeSeq2 версии 1.30.1. Значения экспрессии для отдельных кодирующих последовательностей рассчитывали как число на миллион аннотированных чтений. Дифференциально экспрессируемыми считали гены с кратностью изменения экспрессии ≥ 2 (усиление экспрессии) или $\leq 0,5$ (подавление экспрессии). Для ПЦР использовали набор qPCRmix-HS SYBR+HighROX kit и проводили анализ на установке DTX96™ Real-Time System. Уровень экспрессии оценивали относительно контрольных генов EF1- α или TUB2.

Результаты. Дифференциальный экспрессионный анализ был основан на подсчете ридов, отражающих представленность целевых последовательностей в транскриптомах (1) контрольных (неинфицированных и не обработанных элиситорами) проростках, (2) в проростках, обработанных элиситорами, (3) в инфицированных патогеном (*F. oxysporum*) проростках и (4) в обработанных проростках, которые затем были инокулированы патогеном.

В транскриптоме инфицированных проростков *T. kiharae* 16% генов, кодирующих дефензиноподобные пептиды (DEFL), были чувствительны к инфекции, из них у 60% генов экспрессия была подавлена. Сравнение транскриптома обработанных проростков с транскриптомом контрольных свидетельствовало о влиянии элиситоров на экспрессию большего числа генов пшеницы, чем после заражения патогеном. При этом усиление экспрессии было отмечено у 57% генов DEFL. Доля DEG среди DEFL-кодирующих генов была самой высокой после обработки элиситорами и последующего заражения проростков пшеницы *F. oxysporum*. В этом случае, по сравнению с необработанными контрольными проростками, изменилась экспрессия 35% генов, причем у половины из них (51%) она усиливалась.

В опытах с проростками томата были отмечены значительные изменения экспрессии генов пептидов RALFs, участвующих в трансдукции индуцирующего иммунный ответ сигнала, и белков семейства PR-1 (SIPR-1), маркеров SAR. Так, 5 из 7 обнаруженных нами последовательностей, коди-

рующих предшественники RALFs у *S. lycopersicum* (SIRALFs), по-разному реагировали на различные воздействия. Уровень экспрессии SIRALF3, 6 и 7 снижался после инфицирования, в то время как гены SIRALF5 и 6 активировались как в обработанных элиситорами неинфицированных, так и в инфицированных, предварительно обработанных, проростках, а экспрессия генов SIRALF2 и 7 усиливалась только в последнем случае. Кроме того, профилирование транскриптомов проростков томата показало, что уровень экспрессии генов 7 из 8 идентифицированных генов SIPR-1 зависел от вида воздействия. Так, уровень экспрессии SIPR-1.8 был выше при заражении *F. oxysporum*, чем в контрольных растениях, но ниже, чем в проростках, инфицированных грибом после обработки элиситорами. В то же время, заражение патогеном приводило к подавлению гена SIPR-1.5 и не вызывало дополнительных изменений его экспрессии в случае прединокуляционной обработки элиситорами, напротив, ген SIPR-1.6 в последнем случае был подавлен. Экспрессия генов SIPR-1.1, SIPR-1.2 и SIPR-1.3 усиливалась у обработанных элиситорами проростков в ответ на инокуляцию патогеном и была выше, чем в контрольных и инфицированных растениях, а для гена SIPR-1.4. повышенная экспрессия была отмечена при всех обработках.

Анализ экспрессии ряда целевых DEG (два DEFL, SIPR-1, SIRALF7, SIPR-5 и SIICS) с помощью ПЦР подтвердил результаты RNA-seq.

Заключение. Таким образом, с помощью транскриптомного анализа и ОТ-ПЦР в реальном времени мы выявили специфические наборы генов белков пшеницы и томата, изменение экспрессии которых связано с развитием индуцированной устойчивости или ее праймингом. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание молекулярных механизмов действия элиситоров *F. sambucinum*, что в будущем может способствовать их научно обоснованному использованию в сельском хозяйстве в качестве экологически безопасных средств борьбы с фузариозами.

Литература:

1. Shcherbakova L.A., Nazarova T.A., Mikityuk O.D., et al. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2011, 58, 691-701.
2. L. Shcherbakova, T. Odintsova, A. Stakheev, et al. *Front. Plant Sci.*, 2015, 6 (1207), 1-15.
3. Shcherbakova L., Nazarova T., Mikityuk O., et al. *Pathogens*, 2018, 7(3), e61.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА В МОНИТОРИНГЕ ИНВАЗИВНЫХ ФИТОПАТОГЕНОВ

Звягинцев В.Б., Иващенко Л.О.

Белорусский государственный технологический университет. Минск, Беларусь

Актуальность. Одним из важнейших экологических вызовов современности является глобализация биоты Земли, сопровождающаяся инвазиями вредоносных организмов, гибридизацией их с местными близкородственными таксонами, вытеснением аборигенных видов, горизонтальным переносом генов, возникновением новых рас

и видов патогенов. Примеры глобальных инвазий широко известны в медицине и сельском хозяйстве, не менее разрушительны они и для нативных экосистем, включая леса. Применительно к лесному хозяйству и зеленому градостроительству последствиями инвазий часто являются вспышки массового размножения новых вредителей и

эпифитотийное развитие возбудителей болезней растений, приносящие значительный экологический и социально-экономический ущерб [1].

Общемировой тренд возрастания количества инвазий всех таксономических групп живых организмов особенно отчетливо проявляется в нативных и искусственно созданных экосистемах Беларуси на примере дендропагоменов. В настоящее время в стране ежегодно выявляется в среднем 3-4 вида чужеродных возбудителя инфекционных заболеваний древесных растений, а за последние 25 лет зафиксировано не менее 57 инвазивных патогенов преимущественно из царства Грибов. Многие из вновь выявленных видов на момент обнаружения уже прошли этап акклиматизации, а некоторые оказывали существенное влияние на санитарное состояние лесов и парков [2]. Это говорит о низкой эффективности действующей системы мер сдерживания биологических инвазий на региональном и глобальном уровнях, включая карантинные мероприятия.

Известно, что после проникновения в новые регионы (страны, континенты) успешно акклиматизировавшиеся фитопатогены продолжают своё расселение в экологически подходящих условиях. Причем скорость их распространения может измеряться десятками и даже сотнями километров в год. На первый план в сдерживании таких мигрантов выходят мероприятия по лесопатологическому мониторингу древесных насаждений и в этом вопросе имеется ряд сложностей, связанных с оперативностью выявления новых болезней, симптомы которых на начальном этапе инвазии могут быть слабо выражены, либо «замаскированы» под заболевания иного происхождения. Симптомы патологий, вызванных возбудителями в новых условиях, могут также отличаться от «типичных», описанных в нативном ареале. Кроме этого, некоторые патогены в условиях интродукции и тем более на других хозяевах могут существенно менять трофический статус, вызывая новые болезни растений. Учитывая различную этиологию адвентивных инфекций (грибную, бактериальную, вирусную, нематодную и др.) их диагностика «традиционными» методами весьма затруднительна.

Цель: характеристика применяемых методов ДНК-идентификации чужеродных видов фитопатогенов и рассмотрение вопроса их интеграции в систему лесопатологического мониторинга на примере Беларуси.

Методы: обзор литературы и нормативной базы, анализ, синтез.

Основные результаты: В последние десятилетия все чаще используются методы обнаружения и идентификации патогенов на основе ДНК, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и ее варианты — количественная ПЦР (кПЦР), гнездовая ПЦР, мультиплексная ПЦР и цифровая ПЦР (цПЦР). Эти методы часто специфичны, при помощи специальных праймеров они позволяют различать разные виды и даже штаммы фитопатогенов. Наиболее применимым методом для работы с патогенными организмами является ПЦР в реальном времени, который достаточно чувствителен для обнаружения мельчайшего количества ДНК целевого организма, смешанной с материалом окружающей среды или ДНК хозяина, а использование зондов гидролиза (зондов TaqMan) обеспечивает допол-

нительный уровень специфичности, тем самым позволяя различать близкородственные виды с небольшим количеством полиморфных сайтов [3].

Другими перспективными изотермическими методами, являются рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA), преимущество которой заключается в отсутствии потребности в начальном этапе денатурации ДНК [4], репликация по катящемуся кругу (RCA), амплификация смещением цепи (SDA), хеликаза-зависимая амплификация (HPA) и метод амплификации нуклеиновых кислот (NASBA) [5].

Однако, все перечисленные выше методы, несмотря на свои достоинства, все же имеют некоторые ограничения. На самом деле, все приведенные молекулярные методы требуют априорных знаний об изучаемых патогенах, с целью разработки специфических праймеров. Поэтому они подходят только для целенаправленного анализа, но не для идентификации неизвестных видов патогенов. Чтобы преодолеть такие ограничения, были разработаны подходы на основе метагеномики, которые позволяют проводить нецелевой анализ. Эти подходы обычно основаны на высокопроизводительном секвенировании (NGS), и наиболее известными из них являются метабаркодирование и метод дробовика [6].

В виду своей сложности, необходимости в высококвалифицированном персонале и специальном дорогостоящем оборудовании методы молекулярной диагностики могут использоваться только в специализированных научных центрах, оказывающих услуги учреждениям лесного хозяйства ответственным за мониторинг карантинных объектов в лесном фонде. Для выполнения этих функций в Беларуси созданы Фитопатологический центр лесных древесных видов при Институте леса НАН Беларуси и Отраслевая лаборатория защиты леса при БГТУ. В тоже время штатный лесопатологический мониторинг, проводимый лесохозяйственными учреждениями, не рассчитан на раннее обнаружение новых патологий древесных растений, особенно при их низкой встречаемости и распространенности. Для ведения целенаправленного мониторинга карантинных и инвазивных объектов предлагается разработать для лесозащитной службы страны алгоритмы прогнозирования их распространения и выявления в лесном фонде с задействованием возможностей лабораторий.

Выводы. В научных кругах применение методов молекулярно-генетической диагностики, стало неким «золотым стандартом» и частью негласного обязательного протокола при фиксации нового вида микроорганизмов для региона. Повышение эффективности лесопатологического мониторинга и сдерживания инвазий вредоносных фитопатогенных организмов возможно путем интеграции достижений ДНК-анализа в практическую деятельность лесозащиты.

1. Звягинцев В.Б. и др. Распространение инвазивного возбудителя некроза ветвей ясеня аскомицета *Hymenoscyphus fraxineus* в европейской части России // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. — 2023. — № 244. — С. 88–117.

2. Ярук А.В. Звягинцев В.Б. Распространенность халарового некроза в насаждениях и посадках ясеня обыкновенного // Труды БГТУ, «Лесное хозяйство». — 2015. № 174. — С. 207–210.

3. Lamarche J. et al. Molecular detection of 10 of the most unwanted alien forest pathogens in Canada using real-time PCR // PLoS One. — 2015. — Vol. 10 (8). — P. e0134265.

4. Cha D. et al. Point-of-care diagnostic (POCD) method for detecting *Bursaphelenchus xylophilus* in pinewood using recombinase polymerase amplification (RPA) with the portable optical isothermal device (POID) // PLoS One. — 2020. — Vol.

15 (1). — P. e0227476.

5. La Porta N., Hietala A. M., Baldi P. Bacterial diseases in forest trees // Forest Microbiology. — Academic Press, 2023. — P. 139–166.

6. Esposito A. et al. Bioinformatics for agriculture in the next-generation sequencing era // Chemical and Biological Technologies in Agriculture. — 2016. — Vol. 3. — P. 1–12.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-БАРКОДИНГА ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ НАХОДКИ СОСНОВОГО ПОХОДНОГО ШЕЛКОПРЯДА *THAUMETOPOEA PITYOSAMPA* (LEPIDOPTERA: NOTODONTIDAE) НА ЧЕРНОМОРСКОМ ПОБЕРЕЖЬЕ РОССИИ

Карпун Н.Н.^{1,2}, Гомбоц С.³, Кириченко Н.И.^{1,4,5}

¹ Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова (СПбГЛТУ), Санкт-Петербург, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук» (ФИЦ СНЦ РАН), Сочи, Россия

³ Крань, Словения

⁴ Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия

⁵ Сибирский федеральный университет (СФУ), Красноярск, Россия

Инвазии растительноядных насекомых в последние десятилетия приобретают всё больший масштаб. На юге европейской части России с начала XXI века выявлено свыше 50 новых видов насекомых-фитофагов [Карпун, 2018]. Мягкий климат, отсутствие естественных врагов и широкая кормовая база позволяют новым вредителям легко адаптироваться в новых для них условиях. Наиболее существенный вред естественным и искусственным насаждениям был нанесен самшитовой огневкой (*Cydalima perspectalis* Walker), пальмовым мотыльком (*Paysandisia archon* Burmeister), коричнево-мраморным клопом (*Halyomorpha halys* Stål), кипарисовой радужной златкой (*Lamprodila festiva* L.) [Волкович, Карпун, 2017; Гниненко и др., 2014; Карпун и др., 2020; Musolin et al., 2022].

До настоящих исследований на территории России (Кавказ) отмечались только залетные особи южного соснового походного шелкопряда *Thaumetopoea pityosampa* (Denis & Schiffermüller, 1775) (Lepidoptera: Notodontidae) [Синев, 2019]. А морфологическое сходство гусениц и имаго этого вида с встречающимся на территории Калининградской области *T. pinivora* (Treitschke, 1834) требует подключения молекулярно-генетических методов идентификации.

Целью данных исследований было подтвердить видовую принадлежность насекомых рода *Thaumetopoea* (Lepidoptera: Notodontidae), сформировавших устойчивую популяцию на Черноморском побережье России.

Материалы и методы. Выявление гусениц фитофага осуществлено в декоративных насаждениях Федеральной территории Сириус в ходе мониторинга методом неоднократных трансектных маршрутных обследований. Гусеницы, относящиеся к роду *Thaumetopoea* sp., были выявлены

ежегодно, в период с 2021 по 2023 гг., в январе-феврале, в момент питания на сосне итальянской *Pinus pinea* L. и миграции. Собранных гусениц помещали в инсектарий, в контейнеры объемом 20 л с большим количеством корма — ветвей *P. pinea* и содержали при температуре $+23\pm 2$ °C и относительной влажности $65\pm 5\%$ до получения имаго. Полученные бабочки (15 экземпляров) хранятся в коллекции ФИЦ «Субтропический научный центр РАН». Бабочек идентифицировали по морфологии [de Freina, Witt, 1987]. Задние ноги двух бабочек (самца и самки) использовали для ДНК-баркодирования для уточнения вида и определения ближайших «соседей» в генетической базе BOLD (The Barcode of Life Data System) — образцов шелкопряда, с которыми образцы с юга России имеют наибольшее сходство. Молекулярно-генетические исследования проводились в Канадском центре ДНК-баркодинга (CCDB, Canadian Centre for DNA barcoding) при Гуэлфском университете (Канада). ДНК-баркодирование (секвенирование участка гена субъединицы I митохондриальной цитохром с-оксидазы (COI) длиной в 658 п.н.) осуществлялось с применением метода Сэнгера. Определение таксономической принадлежности образцов по ДНК-баркодам проводили на платформе BOLD [Ratnasingham, Hebert, 2007].

Основные результаты. По морфологическим характеристикам — внешней морфологии (строению головной капсулы, в частности морфологии гребня и антенн), а также строению генитального аппарата самцов — изученные образцы были отнесены к виду *Thaumetopoea pityosampa*. В генетической базе BOLD сиквенсы самца и самки оказались идентичны таковым образцов *T. pityosampa* из стран Центральной Европы и соответствовали коду вида (BOLD:AAK2887) в данной генетической базе.

Заключение. По молекулярно-генетическим характеристикам подтверждена видовая принадлежность образцов шелкопряда из Сочи к *T. pityosatra*. По всей видимости, этот чужеродный вид уже успел сформировать популяцию в насаждении сосны итальянской на Федеральной территории Сириус. Вектором инвазии, скорее всего, являлся крупномерный посадочный материал, привезенный из Италии.

Исследования выполнены в рамках государственного задания ФИЦ ШЦ РАН, тема FGRW-2022-0006 (фитосанитарный мониторинг декоративных насаждений) и гранта Российского научного фонда № 21-16-00050 «Формирование современных ареалов растительноядных насекомых-инвайдеров и их экофизиологические адаптации к условиям юга России» (<https://rscf.ru/project/21-16-00050/>, молекулярные исследования).

Список литературы:

Волкович М.Г., Карпун Н.Н. Новый инвазивный вид златок в фауне России — вредитель кипарисовых *Lamprodila (Palmar) festiva* (L.) (Coleoptera, Buprestidae) // Энтомологическое обозрение. 2017. Т. 96, № 2. С. 235-248.

Гниненко Ю.И., Ширяева Н.В., Щуров В.И. Самшитовая огневка — новый инвазивный организм в лесах Российского Кавказа // Карантин растений. Наука и практика. 2014. № 1 (7). С. 32-36.

Карпун Н.Н. Структура комплексов вредных организмов древесных растений во влажных субтропиках России и биологическое обоснование мер защиты: дисс. ... д-ра биол. наук. Сочи, 2018. 399 с.

Карпун Н.Н., Михайлова Е.В., Шошина Е.И. Эффективность различных приемов защиты пальм от пальмового мотылька во влажных субтропиках России // Субтропическое и декоративное садоводство. 2020. Вып. 75. С. 107-116. doi: 10.31360/2225-3068-2020-75-107-116

Синёв С.Ю. (ред.). Каталог чешуекрылых (Lepidoptera) России. Изд. 2. СПб: Зоологический институт РАН. 2019. 448 с. de Freina J.J., Witt T.J. Thaumetopoeidae. In: Die Bombyces und Sphinges der Westpalaearktis. Germany: Munchen, Verlag GmbH, Edition Forschung & Wissenschaft, 1987. PP. 285–296.

Musolin D.L., Kirichenko N.I., Karpun N.N., Aksenenko E.V., Golub V.B., Kerchev I.A., Mandelshtam M.Yu., Vasaitis R., Volkovitch M.G., Zhuravleva E.N., Selikhovkin A.V. Invasive and Emerging Insect Pests in Forests and Urban Plantations of Russia: Origin, Pathways, Damage, and Management // Forests. 2022. Vol. 13. 521. <https://doi.org/10.3390/f13040521>

Ratnasingham S., Hebert P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>) // Molecular Ecology Notes. 2007. Vol. 7. P. 355–364.

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ *BIDENS PILOSA* L. (MAGNOLIOPHYTA, ASTERACEAE)

Кулаков В.Г., Кулакова Ю.Ю., Володина Е.А., Вишняков К.Н.

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р.п. Быково, г.о. Раменский, Россия

Введение: сорные растения имеют более высокий потенциал вредоносности для сельскохозяйственных культур по сравнению с вредителями и возбудителями болезней, при этом поддаваясь эффективному управлению (Oerke E.C., 2005). Чрезвычайно эффективными методами управления сорняками являются карантинные меры — предотвращение распространения на свободные от них территории. В Российской Федерации сорные растения с высокой прогнозируемой вредоносностью внесены в перечень карантинных объектов. Как мера предотвращения распространения карантинных объектов используется проведение лабораторных исследований образцов продукции для выявления засорения карантинными объектами в соответствии со ст. 26 Федерального закона от 21.07.2014 N 206-ФЗ «О карантине растений» с дальнейшей выбраковкой или обеззараживанием партий. Антропогенное непреднамеренное распространение сорных растений обычно происходит с помощью диаспор (семян, плодов, соплодий, реже вегетативных частей), что создает затруднения для лабораторной диагностики, так как абсолютное большинство существующих методов идентификации растений основаны на признаках всего растения, для идентификации которых требуются высококвалифицированные специалисты. Использование методов молекулярной диагностики позволит повысить объективность лабо-

раторных испытаний. Молекулярная диагностика таксонов сосудистых растений уже применяется при определении состава продукции, в фармакогнозии и в криминалистике, но в практике карантина растений не используется из-за отсутствия разработанных и пригодных к внедрению методов, «золотым стандартом» которых является метод ПЦР с детекцией в реальном времени.

Черда волосистая — *Bidens pilosa* L. является широко распространенным вредоносным сорняком во многих регионах мира, внесенным в перечень карантинных объектов для РФ, плоды которого встречаются в подкарантинной продукции. Существующие морфологические методы идентификации плохо воспроизводимы специалистами испытательных лабораторий и не позволяют уверенно отличить плоды череды волосистой от морфологически схожих с ней видов секции *Psilocarpea* DC.

Цель и задачи: цель исследования — разработать молекулярный метод диагностики череды волосистой на основе изучения генетического разнообразия сорных растений секции *Psilocarpea*. Для достижения данной цели сформулированы задачи требующие решения: создание репрезентативной коллекции сорных растений рода Черда, поиск информативных маркерных участков генома и, собственно, разработка тест-системы, применимой в существующих фитосанитарных испытательных лабораториях.

Материалы и методы: материалом для исследования стала созданная авторами гербарная и карпологическая коллекции в составе 166 образцов сорных видов рода Черёда секции *Psilocarpaea* (*B. pilosa*, *B. subalternans* DC., *B. bipinnata* L., *B. parviflora* Willd.), собранных в Южной Америке, Северной Америке, Африке, Юго-восточной Азии в 60 местообитаниях. Все образцы были надежно идентифицированы до вида по комплексу морфологических признаков, для чего проводилось выращивание черед из плодов в карантинной теплице и фитотронах ФГБУ «ВНИИКР» до стадии цветения и плодоношения. Для проведения генетических исследований «in silico», использовались генетические последовательности депозитария GenBank (NCBI). ДНК образцов выделяли модифицированным методом Дойля (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987), расшифровка нуклеотидных последовательностей проводилась на генетическом анализаторе Genetic Analyzer AB-3500 методом капиллярного электрофореза, работа с генетическими данными проводилась в среде Uipro UGENE, подбор праймеров и зонда выполнялся с помощью инструмента BLAST 3, отработка тест-системы производилась с использованием детектирующего амплификатора Bio-Rad CFX96 Touch.

Основные результаты: изучен полиморфизм маркерных участков хлоропластного генома: NdhF-rpl32, trn^{HGUG}-psbA, rpl32-trnL, trnK-matK, trn^{TUGU}-trn^{LAAA}, Rpl16, rbcL, trnV-ndhC. Выявлен значительный полиморфизм в межгенном спейсере NdhF-rpl32, а в остальных участках полиморфизм не был выявлен или он был незначительным (trn^{HGUG}-psbA и trn^{TUGU}-trn^{LAAA}). По участку NdhF-rpl32 выделено три различных гаплотипа *B. pilosa* и два гаплотипа у близких видов. Также изучен полиморфизм ядерного рибосомального участка ITS1-5.8S-ITS2, в котором выделены два гаплотипа для *B. pilosa* и пять гаплотипов для других видов.

Выводы: При анализе нуклеотидных последовательностей и попытке подбора праймеров/зонда для участка NdhF-rpl32 показано, что три значительно отличающихся гаплотипа *B. pilosa* не позволяют разработать единую тест-систему для идентификации. Кроме того, обнаружены растения (VNIICR S-01102, Мексика, штат Синалоа) с гаплотипом

данного участка, характерным для *B. bipinnata*, но с морфологическими признаками *B. pilosa*. В то же время, анализ последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 показал тесную связь выделенных гаплотипов с морфологическими признаками *B. pilosa*, что позволяет использовать этот регион для разработки диагностирующей тест-системы.

На основании полученных данных разработана тест-система ПЦР с детекцией в реальном времени с оригинальным дизайном праймеров и зонда. Специфичность разработанной тест-системы подтверждена анализом «in silico» с привлечением 146 депонированных в GenBank последовательностей видов рода Черёда, а также проведением практических тестов на основе коллекции черед. В настоящее время идет отработка регламента лабораторного использования разработанной тест-системы.

Из дополнительных результатов исследования следует отметить вывод об отсутствии морфологических и генетических отличий по изученным маркерным участкам выделенного некоторыми авторами Центральноамериканского вида *Bidens odorata* Cav. (Ballard R., 1986) от *B. pilosa*, а также первое указание *B. subalternans* для территории Африки (VNIICR S-01428, Танзания, провинция Морогоро).

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№12304250048-5 «Разработка молекулярно-генетических и морфологических методов идентификации сорных видов растений, включенных в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС»).

Список литературы:

1. Oerke EC (2005) Crop losses to pests. *J Agr Sci* 144:31–43. doi:10.1017/S0021859605005708
2. NCBI: The National Center for Biotechnology Information (NCBI) — URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
3. Doyle J.J., Doyle J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochemistry Bulletin*. V. 19. P. 11-15.
4. Ballard R. (1986) *Bidens pilosa* Complex (Asteraceae) in North and Central America // *American Journal of Botany*. Vol. 73, № 10, P. 1452-1465.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *PSEUDOMONAS FUSCOVAGINAE* МОЛЕКУЛЯРНЫМИ И КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Десятерик А.А.^{1,2}, Словарева О.Ю.¹

¹ ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия

² Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Введение. По статистическим данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (ФАОСТАТ) в 2021 году Российская Федерация занимает одну из лидирующих позиций по производству и посевным площадям зерновой продукции. Основным барьером для экспорта продукции является наличие возбудителей бактериозов зерновых культур, которые регулируются фитосанитарными требованиями стран-им-

портеров. Крупными импортерами пшеницы являются Египет и Пакистан, предъявляющие требования к фитосанитарному состоянию продукции, в том числе к содержанию в зерне бактерий. Возбудитель бурой бактериальной гнили листовой оболочки злаковых культур *Pseudomonas fuscovaginae* — карантинный организм, в отсутствие которого предъявляют требования страны-импортеры. Основным способом распространения *Pseudomonas fuscovaginae*

являются инфицированные семена, при этом симптомы чаще всего не наблюдаются, что затрудняет идентификацию. Неотъемлемой частью процесса выявления бактериозов является изоляция культуры из лабораторных проб. Дальнейшее тестирование при помощи современных молекулярно-диагностических методов позволяют с высокой точностью и быстротой идентифицировать бактерию в зерновой продукции. Одним из эффективных методов является ПЦР в реальном времени.

Целью настоящей работы являлось установление зависимости порогового цикла (Ct) ПЦР-РВ от концентрации в исследуемом образце возбудителя бурой бактериальной гнили листовой оболочки злаковых культур *Pseudomonas fuscovaginae* при его выявлении и идентификации.

Материалы и методы. Объектом исследования было зерно пшеницы, свободное от *Pseudomonas fuscovaginae*, и штамм 0335 *Pseudomonas fuscovaginae* коллекции ФГБУ «ВНИИКР».

Пробоподготовку проводили по уже оптимизированной методике (Мувинги и др., 2022). Аналитические пробы, полученные в результате пробоподготовки, инокулировали суспензиями *Pseudomonas fuscovaginae*

Для приготовления суспензий использовали 2х-точную чистую живую культуру *Pseudomonas fuscovaginae*. Концентрацию бактерий в приготовленных суспензиях определяли методом Коха, высевая с помощью шпателя Дригальского по 50 мкл 3, 4, 5 и 6 разведений чистой культуры *Pseudomonas fuscovaginae* в стерильной дистиллированной воде на 4 чашки Петри и проводили подсчет колоний спустя 7 суток инкубирования чашек при 25°C в инкубаторе MIR-254, «Panasonic Healthcare Co. Ltd.» (Япония).

В пробирки с экстрактом семян пшеницы добавляли бактериальную суспензию 3, 4, 5 разведений в соотношении 9:1. В качестве отрицательного контроля использовали незараженную аналитическую пробу семян. Посев проводили с помощью шпателя Дригальского на чашки Петри со средой R2A по 20 мкл экстракта с растяжением на 4 чашки.

На 10 день после посева проводили скрининг методом ПЦР. Для этого выделяли ДНК сорбционным методом

(«Фитосорб», Синтол, Россия), используя 200 мкл каждой аналитической пробы в трехкратной повторности, а также 200 мкл 3, 4 и 5 разведений бактериальных суспензий в дистиллированной воде. В работе использовали детектирующий амплификатор ДТпрайм 5М6 (ДНК-Технология, Россия) и CFX96 (Bio-Rad, США), а также коммерческий набор *Pseudomonas fuscovaginae*-РВ (Синтол, Россия).

Основные результаты. При культивировании колоний на чашках Петри со средой R2A спустя 7 суток инкубирования при 25°C посева зараженной аналитической пробы они по форме были круглые, глянцевые, неправильной формы, беловатые. При ПЦР-тестировании была подтверждена их принадлежность к виду *Pseudomonas fuscovaginae*.

Для оценки эффективности метода изоляции проб семян было выделен ДНК из полученных аналитических проб и проведено ПЦР-тестирование, опираясь на результат определения числа колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) в тестируемых бактериальных суспензиях.

Тестирование образцов ДНК, выделенных из бактериальных суспензий, набором *Pseudomonas fuscovaginae*-РВ, Синтол (Россия) позволило обнаружить ДНК *P. fuscovaginae* в образцах ДНК с концентрацией целевой бактерии 10² КОЕ/мл. При тестировании образцов зараженных аналитических проб семян чувствительность составила 10⁴ КОЕ/мл.

Выводы. В результате исследования были установлены критерии применимости метода изоляции культуры *Pseudomonas fuscovaginae* из семян пшеницы. Оценка применимости данного метода изоляции показала, что он может применяться в случае заражения пробы пшеницы в концентрации 1*10⁴ КОЕ/мл, что соответствует пороговому циклу флуоресценции (Ct) 32,0 RFU при использовании набора *Pseudomonas fuscovaginae*-РВ, Синтол (Россия) на амплификаторе ДТпрайм 5М6 (ДНК-Технология, Россия), и (Ct) 31,5 RFU при использовании *Pseudomonas fuscovaginae*-РВ, Синтол (Россия) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Эти данные могут быть использованы для проведения исследований в лабораториях в области фитосанитарии и карантина растений.

ДИАГНОСТИКА ФИТОПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР МЕТОДОМ ИФА

Ахба Е.Д., Павлов К.В.

ФГБНУ «Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства» (ФГБНУ ФНЦ Садоводства) Россия, 115598 г. Москва, ул. Загорьевская 4.
e-mail: katya0565@yandex.ru, тел.: 8 (903) 000-05-65

Наличие фитопатогенных вирусов является важным фактором при возделывании плодовых и ягодных культур, влияющим на урожайность и развитие растений. Зараженные насаждения более восприимчивы к грибным и бактериальным болезням и в комплексе наносят существенный экономический ущерб хозяйствам. Производство безвирусного посадочного материала является приоритетным направлением работы производителей саженцев расте-

ний и требует совершенствования и установления норм проведения диагностики фитопатогенных вирусов.

В лаборатории репродуктивной биотехнологии ФГБНУ ФНЦ Садоводства проводится регулярное тестирование растений на наличие фитопатогенных вирусов с целью производства безвирусного посадочного материала.

Целью исследований являлось тестирование растений косточковых культур на наличие фитопатогенных вирусов.

В качестве объектов исследования использовались растения сливы домашней (*Prunus domestica*), вишни обыкновенной (*Prunus vulgaris*), черешни (*Prunus avium*). Растения тестировались на вирусы косточковых культур, регламентированные ГОСТ Р 59653-2021: PPV — потивирус шарки слив, PNRSV — вирус некротической кольцевой пятнистости сливы, ACLSV — вирус хлоротической пятнистости листьев яблони, PDV — вирус карликовости сливы, CLRV — скручивания листьев черешни методом иммуноферментного анализа.

Планшет с иммуноглобулинами инкубировали в холодильной камере при температуре 4 °С в течение 16 ч. Вносили в каждую лунку планшета по 200 мм³ пробы растительного экстракта, полученной при гомогенизации с экстрагирующим буфером (пропорция 1:20, где 1 — это навеска образца, а 20 — объем буферного раствора) в гомогенизаторе Precellys Evolution. Использовалось по две лунки для каждого образца и для положительного контроля, отрицательный контроль вносился также в две лунки. Планшет закрывали и инкубировали в холодильной камере при температуре 4 °С в течение 16 ч и трижды промывали лунки планшета промывочным буферным раствором. Для выявления вирусов готовили рекомендуемое разведение конъюгата в буферном растворе. Вносили в каждую лунку планшета по 200 мм³ разведенных поликлональных антител. Планшет закрывали и инкубировали в термостатируемом встряхивателе при температуре 37 °С в течение 4 ч и трижды промывали лунки планшета промывочным буферным раствором. Далее готовили раствор субстрата (1 мг р-нитрофенил-фосфата на 1 см³ субстратного буферного раствора) и вносили по 200 мм³ в каждую лунку планшета. Планшет закрывали и инкубировали при температуре от 18 °С до 25 °С, а затем считывали показания на микропланшетном ридере AMR-100 при длине волны 405/492 нм через 60 мин.

В результате диагностики растений косточковых

культур, выявлены PNRSV — вирус некротической кольцевой пятнистости сливы, ACLSV — вирус хлоротической пятнистости листьев яблони, PDV — вирус карликовости сливы. При визуальном осмотре насаждений выявлено лишь несколько растений с характерной симптоматикой, в то время как остальные растения выглядели здоровыми, несмотря на положительный результат диагностики их методом ИФА. Это говорит о необходимости проведения регулярного тестирования для уточнения вирусологического статуса растений.

Растения с выявленными фитопатогенными вирусами будут использованы в дальнейшей работе в качестве положительных контролей при разработке диагностики вирусов методом ПЦР.

Работа выполнена при поддержке: Государственного задания № 0432-2022-0001 Воспроизводство и сохранение ценных генотипов плодовых и ягодных культур методами новых биотехнологий.

Список используемых источников:

1. Аниткина И.Н. Сейтжанов Д.Д. (составители), Фитовирусология: учебное пособие — Павлодар: Кереку, 2015 — 104 с
2. К. В. Метлицкая, М. Т. Упадышев, А. Д. Петрова, Г. Ю. Упадышева, РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ВРЕДНОСНЫХ ВИРУСОВ В НАСАЖДЕНИЯХ СЛИВЫ И АЛЫЧИ В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ / К. В. Метлицкая, М. Т. Упадышев, А. Д. Петрова, Г. Ю. Упадышева, // ПЛОДОВОДСТВО И ЯГОДОВОДСТВО РОССИИ. — Москва: ФГБНУ «Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства», 2018. — С. 152-156.
3. Упадышев М. Т. Диагностика вирусов плодовых и ягодных культур — важный этап в производстве сертифицированного посадочного материала / М. Т. Упадышев // Садоводство и виноградарство. — 2018. — № 2. — С. 43-48.

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОГО ПРОТОКОЛА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР

Спивак В. В., Янковская А. А., Капитова И. А.

ФГБНУ «Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства» (ФГБНУ ФНЦ Садоводства) Россия, 115598 г. Москва, ул. Загорьевская 4.
e-mail: vl.spivak@mail.ru, тел.: 8 (915) 359-06-37

В лаборатории репродуктивной биотехнологии ФГБНУ ФНЦ Садоводства проводятся молекулярно-генетические исследования плодовых и ягодных культур с целью паспортизации сортов и идентификации генов, связанных с хозяйственно ценными признаками культурных растений.

В связи существующей проблемой выделения растительной ДНК высокой концентрации и чистоты из растительного материала косточковых культур, актуальным является подбор оптимального протокола выделения.

Целью исследований являлась оптимизация метода выделения ДНК из растительного материала косточковых культур.

В рамках опыта по подбору оптимальной методики выделения ДНК из листьев вишни обыкновенной (*Prunus cerasus* L.), черешни (*Prunus avium* (L.) L.), алычи (*Prunus*

x rossica Erem.) и сливы домашней (*Prunus domestica* L.) была проведена апробация четырёх модификаций ЦТАБ-метода.

Выделение каждого образца проводилось двукратно в двух повторах.

Каждый образец выделенной ДНК тестировался на предмет ингибирования амплификации путём постановки ПЦР в реальном времени. Ингибирования реакции выявлено не было ни для одного протокола выделения ДНК.

Для оценки качества выделенной ДНК проводился спектрофотометрический анализ. Оценивалась концентрация выделенной ДНК и отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280) и 260 и 230 нм (A260/230) для оценки чистоты.

Для метода выделения ДНК с добавлением 1,5% ЦТАБ (цетилтриметиламмония бромид) и 1,5% PVP (поливинилпирролидон) диапазон концентраций выделенной ДНК составил от 31 до 387,3 мкг/мл, средняя концентрация — 130. Соотношение A260/280 варьировалось от 2,01 до 2,12, среднее значение 2,08, соотношение A260/230 от 1,37 до 2,24, среднее значение — 1,84.

Для метода выделения ДНК с добавлением 1,5% ЦТАБ, 1,5% PVP, 0,2% 2-меркаптоэтанол диапазон концентраций выделенной ДНК составил от 24,3 до 431,1 мкг/мл, средняя концентрация — 166,7. Соотношение A260/280 варьировалось от 1,10 до 2,24, среднее значение — 2,03, соотношение A260/230 от 1,37 до 2,24, среднее значение 1,81.

Для метода выделения ДНК в модификации по Дрейперу [1] диапазон концентраций выделенной ДНК составил от 13,7 до 342 мкг/мл, средняя концентрация — 97,2. Соотношение A260/280 варьировалось от 1,79 до 2,01, среднее значение — 1,90, соотношение A260/230 от 0,96 до 2,25, среднее значение 1,81.

В ходе проведения исследования был предложен ме-

тод выделения ДНК, объединяющий этапы из различных вышеперечисленных методов.

Для оптимизированного метода выделения растительной ДНК диапазон концентраций выделенной ДНК составил от 101,1 до 598,3 мкг/мл, средняя концентрация — 247,4. Соотношение A260/280 варьировалось от 1,99 до 2,08, среднее значение 2,00, соотношение A260/230 от 1,80 до 2,03, среднее значение — 1,9. Данный метод выделен как наиболее эффективный.

В результате сравнения методов выделения ДНК было выявлено, что метод, оптимизированный в лаборатории репродуктивной биотехнологии, превосходит другие модификации ЦТАБ метода по показателям чистоты и получаемым концентрациям выделенной ДНК, что делает его оптимальным для выделения ДНК из растительного материала косточковых культур.

Список используемых источников

1. Дж Д., Скотт Р., Армитидж Ф. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. — М.: Мир, 1991. — С. 236-254.

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ КАРАНТИННЫХ ВИРУСОВ КАРТОФЕЛЯ

Приходько Ю.Н., Шнейдер Ю.А., Живаева Т.С., Кондратьев М.О., Лозовая Е.Н., Каримова Е.В., Башкирова И.Г.

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР») 140150, Московская область, Раменский г.о., р.п. Быково, ул. Пограничная, 32

Введение. Андийский латентный тимовирус картофеля (APLV), Андийский комовирус крапчатости картофеля (APMoV), иларвирус пожелтения картофеля вирус (PVV), теповирус Т картофеля (PVT), альфануклеорабдовирус желтой карликовости картофеля (PYDV) и неповирус черной кольцевой пятнистости картофеля (PBRV) являются эндемичными американскими вирусами и представляют большую опасность для картофелеводства РФ. Все эти вирусы являются карантинными объектами для ЕОКЗР, ЕАЭС и многих других стран мира. За исключением APLV, диагностические протоколы для остальных карантинных вирусов картофеля отсутствуют, что существенно затрудняет лабораторную экспертизу импортной подкарантинной продукции картофеля.

Целью исследований, проводимых в ФГБУ «ВНИИКР», являлась разработка методов выявления и идентификации карантинных вирусов картофеля, основанных на использовании серологических и молекулярных методов.

Материалы и методы. Эксперименты проводили с референтными изолятами различных вирусов, заражающих растения картофеля: AMV, APLV, APMMV, APMoV, AVB, CYDV, INSV, PAMV, PBRV, PLRV, PMTV, PotLV, PVA, PVM, PVS, PVT, PVV, PVX, PVY, PYDV, PVV, TBRV, TMV, ToRSV, TRV, TRSV, TSWV и WPMV (все — DSMZ, Германия).

Серологическую диагностику APLV, APMoV, PBRV, PVT, PYDV и PVV обрабатывали с использованием тест-систем для ИФА нескольких фирм-производителей: Adgen (Великобритания), Agdia (США), Bioreba (Швейцария),

DSMZ и Loewe (обе — Германия). Тест-системы использовали в соответствии с инструкциями фирм-производителей и протоколом Cambra & Shneyder (2015).

Совместно с ООО «Агродиагностика» (Россия) проведены испытание и валидация диагностических наборов для ПЦР в «реальном времени» (ПЦР-РВ) к APLV, APMV, PBRV и PYDV. Проведена отработка скрининговых и подтверждающих тестов на наличие APLV, APMoV, CYDV, PBRV, PVT, PYDV и PVV с использованием различных форматов ПЦР-РВ и классической ПЦР. В связи с отсутствием молекулярных методов диагностики для ряда объектов были разработаны собственные оригинальные праймеры.

Основные результаты. До проведения наших исследований специфические праймеры для диагностики PVV отсутствовали. Для разработки таких праймеров нами на первом этапе была использована гнездовая (nested) ПЦР с универсальными праймерами к гену репликазы представителей рода Iarvirus Ilapol up2/Ilapol do4 и Ilapolnest up3/Ilapolnest do5 (Maliogka et al., 2007). Для изолята PVV PV-0706 была определена последовательность нуклеотидов гена репликазы, депонированная в генбанк NCBI под номером KP996592. В последующем к данной последовательности нами было разработано 10 пар праймеров. Лучшие результаты по специфичности, чувствительности и воспроизводимости результатов были получены для праймеров PVV-rep-3F/PVV-rep-3R и разработанного к ним зонда PVV-labv3-R, которые рекомендуются нами для проведения скрининго-

вых тестов на наличие PVV. Для последующих подтверждающих тестов наиболее целесообразно использовать универсальные праймеры Ilar1F5/Ilar1R7 (Maliogka et al., 2007) с последующим секвенированием продуктов амплификации.

Для выявления и идентификации теповируса Т картофеля (PVT) нами разработан межгосударственный стандарт (ГОСТ 33539-2015), в котором рекомендуется проведение скрининговых тестов методом ИФА с тест-системой к PVT фирмы Adgen и подтверждающих тестов в формате 2-этапной классической ОТ-ПЦР с праймерами PVT-1/PVT-2 (Lizarraga et al., 2000), комплементарных гену транспортно-белка целевого объекта, и разработанных нами праймеров PVT-labv-3F/PVT-labv-3R, амплифицирующих участок гена РНК-зависимой РНК-полимеразы PVT.

Установлено, что для выявления близкородственных APLV и Андийского тимовируса слабой мозаики картофеля (APMMV) скрининговые тесты наиболее целесообразно проводить с тест-системами для ИФА фирмы DSMZ, содержащими антисыворотку AS-0003, специфичную к APMMV, и антисыворотку AS-0004, специфичную к штаммам APLV-Col1 и APLV-Col2. В качестве дополнительного скринингового теста целесообразно использовать также набор реагентов для ПЦР-РВ к APLV фирмы Агродиагностика, который позволяет выявлять APMMV и штамм APLV-Col-2. В качестве подтверждающего теста нами рекомендуется использовать классическую ОТ-ПЦР с праймерами EM3/Al-a-mod3C (Koenig & Ziebell, 2014), специфичных к обоим известным штаммам APLV (Col1 и Col2) и не реагирующих с APMMV.

Установлено, что для проведения скрининговых тестов на наличие АРМоV необходимо параллельное использование двух тест-систем для ИФА фирмы DSMZ с антисыворотками AS-0005 (для выявления штаммов АРМоV-В и АРМоV-С) и AS-0006 (для выявления штамма АРМоV-Н). Для проведения подтверждающих тестов на наличие этого вируса нами валидированы набор реагентов к АРМоV (Агродиагностика)

и праймеры Arpmv-Rpol-up/Arpmv-Rpol-low (Синтол).

Разработан диагностический протокол для выявления и идентификации PBRSV, предусматривающий проведение скрининговых тестов методом ИФА с наборами Adgen (Великобритания), DSMZ или Loewe (обе — Германия) и с набором реагентов для ПЦР-РВ к PBRSV (Агродиагностика), и подтверждающих тестов с праймерами PBRSV-P3F/PBRSV-P4R, PBRSV-P8F/PBRSV-P8R или PBRSV-P9F/PBRSV-P9R (ВНИИКР).

Установлено, что эффективное выявление PYDV достигается с праймерами PYDV(P)up/PYDV(P)low, PYDV(N)up/PYDV(N)low (Синтол) и набором реагентов для ПЦР-РВ к PYDV (Агродиагностика). Наряду с этим нами впервые разработан диагностический протокол для выявления Constricta yellow dwarf virus (CYDV), до 2023 г. считающегося штаммом PYDV.

Заключение. Разработаны методические рекомендации и стандарты организации (СТО) для выявления и идентификации карантинных объектов — вирусов APLV, АРМоV, PBRSV, PYDV и PVV, которые используются во всех лабораториях Россельхознадзора для проведения исследований подкарантинной продукции.

Список литературы:

Тихомирова М.А., Шнейдер Ю.А. Разработка методов диагностики американских вирусов картофеля, создающих опасность для картофелеводства Российской Федерации / В сборнике: Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты. 2018. С. 232-234.

Шнейдер Ю.А., Приходько Ю.Н., Каримова Е.В., Живаева Т.С., Лозовая Е.Н. Разработка методов диагностики вируса метельчатости верхушки картофеля и вируса желтой карликовости картофеля в Российской Федерации / В сборнике: Современные подходы и методы в защите растений. Екатеринбург, 2020. С. 118-119.

Cambra M., Shneyder Y. PM 7/125 (1) ELISA tests for viruses / EPPO Bulletin. 2015. 45(3). 445-449.

ПРИМЕНЕНИЕ НОВОГО ТЕСТА ПЦР В «РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧЕРНОГО БАКТЕРИОЗА ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР *XANTHOMONAS TRANSLUCENS*

Словарева О.Ю.¹, Яремко А.Б.¹, Кашина Ю.Г.¹, Селявкин С.Н.², Дренова Н.В.¹

¹ ФБГУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФБГУ «ВНИИКР»), Быково, Россия

² Воронежский филиал ФБГУ «ВНИИКР», Воронеж, Россия

Введение. Согласно данным, размещенным в Агроэкологическом атласе России и сопредельных стран (<http://agroatlas.ru/>), электронной библиотеке Международного центра сельского хозяйства и биологических наук (<https://www.cabidigitallibrary.org/>), базе данных Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (<https://gd.eppo.int/>) и научных публикациях, возбудитель черного бактериоза зерновых культур *Xanthomonas translucens* широко распространен на зерновых культурах, произрастающих в Российской Федерации. Вид *Xanthomonas translucens* насчитывает 10 патоваров, вызывающих заболевания зерновых растений — пшеницы,

ячменя, ржи, тритикале и овса, а также злаковых трав. Молекулярная диагностика бактерии на территории РФ, насколько нам известно, ранее не проводилась в связи с отсутствием диагностических ПЦР-тестов. Разработанный в 2022 году ПЦР-тест в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) 5F6/5R6/5P6.3 для идентификации всех патоваров *Xanthomonas translucens* может послужить инструментом актуализации сведений о распространении фитопатогена на территории нашей страны.

Цель исследования заключалась в выявлении и идентификации возбудителя черного бактериоза зерновых культур *Xanthomonas translucens* на территории России.

Материалы и методы. ПЦР-тестирование проводили с ДНК 338 образцов вегетирующих растений пшеницы, ячменя, ржи, тритикале и овса, собранных в 2019–2022 годах в Москве, Республике Крым, Ставропольском крае, Волгоградской, Тамбовской, Тульской и Ростовской областях. ДНК выделяли набором «Проба-ГС», ЗАО «АгроДиагностика», Россия. ПЦР-смесь содержала 14,9 мкл воды, 5 мкл готовой смеси для ПЦР 5X qPCRMix-HS, ЗАО «Евроген», Россия, по 1 мкл праймеров в концентрации 10 пкм/мкл и зонда в концентрации 5 пкм/мкл, 0,1 мкл внутреннего положительного контроля ЗАО «Синтол», Россия и 2 мкл ДНК в концентрации 50–100 нг/мкл. В качестве положительного контроля использовали ДНК штамма DSM 18974. Тестирование проводили на амплификаторе детектирующем ДТпрайм 5М6 «ДНК-Технология», Россия.

Результаты ПЦР на наличие *Xanthomonas translucens* с образцами растений зерновых культур, собранными в Москве на территории полевой опытной станции РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, в Ростовской области (Родионово-Невсетаевский, Мирянковский, Зерноградский, Азовский и Мартыновский районы), в Ставропольском крае (Кочубеевский, Буденновский, Советский, Георгиевский, Андроповский, Александровский, Шпаковский, Новоселицкий и Минерало-

водский районы), в Волгоградской области (Городищенский, Калачевский, Суровикинский, Чернышковский, Клетский, Фроловский, Ольховский, Иловлинский районы и Советский район г. Волгоград), в Республике Крым (Белогорский и Симферопольский районы), Воронежской области (Петропавловский, Бутурлиновский, Бобровский, Богучарский, Рамонский, Таловский и Воробьевский районы), в Куркинском районе Тульской области и Рассказовском районе Тамбовской области были отрицательными. Положительные результаты ПЦР получены для образца овса, собранного в Красногвардейском районе Республики Крым, для образца ячменя из Калачевского района Воронежской области и образца пшеницы из Томского района Томской области.

Выводы. Проведенное исследование позволило установить наличие возбудителя черного бактериоза зерновых культур *Xanthomonas translucens* в 3 образцах зерновых культур из 338 протестированных (частота встречаемости 0,9%). Для получения более объективной информации о распространении фитопатогена требуется проведение анализа большего числа образцов, особенно из регионов, в которых бактерия была выявлена — Республика Крым, Воронежская и Томская области.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ КРИНИВИРУСОВ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИХ ПОТЕНЦИАЛЬНУЮ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОВОЩЕВОДСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Лозовая Е.Н., Живаева Т.С., Приходько Ю.Н.

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР») 140150, Московская область, Раменский г.о., р.п. Быково, ул. Пограничная, 32

Введение. Разработка высокоточных методов выявления и идентификации карантинных и особо опасных вирусов овощных культур являются приоритетной задачей с точки зрения благополучного развития и безопасности овощеводства в Российской Федерации (Каримова и др., 2020, Живаева и др., 2021, Шнейдер и др., 2021, Лозовая и др., 2023). Род *Crinivirus* входит в семейство *Closteroviridae* и включает вирусы с нитевидными извилистыми вирионами длиной от 950 до 2000 нм и диаметром 10–13 нм, геном которых состоит из двух молекул одноцепочечной плюс-смысловой РНК. Криновирусы переносятся различными видами белокрылок и являются вредоносными патогенами различных сельскохозяйственных культур. Входящие в этот род вирусы хлороза томата (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) и инфекционного хлороза томата (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV) включены в Перечень карантинных вредных организмов ЕОКЗР. Диагностика ToCV и TICV в Российской Федерации не отработывалась, что препятствует проведению мониторинга на наличие этих вирусов и исследованию подкарантинной продукции.

Материалы и методы. Эксперименты проводили с референтными изолятами криновирусов CCYV, CYSDV, TICV и ToCV, полученных из коллекции DSMZ (Германия). Выделение нуклеиновых кислот из тестируемых образцов проводили с наборами реагентов Проба-НК (Агродиагно-

стика) и Фито Сорб (Синтол). Обратную транскрипцию, классическую ПЦР и ПЦР в «реальном времени» (ПЦР-РВ) проводили с наборами реагентов отечественных фирм Диалат, Евроген и Синтол, используя универсальные и видоспецифичные праймеры.

Основные результаты. В экспериментах с универсальными праймерами HS-11/HS-12 (Dovas et al., 2002) установлено, что эти праймеры позволяют эффективно выявлять изоляты TICV, избирательно реагируют с изолятами ToCV и не реагируют с изолятами криновирусов желтой карликовости тыквенных (*Cucurbit yellow stunt disorder crinivirus*, CYSDV) и хлоротической желтухи тыквенных (*Cucurbit chlorotic yellows crinivirus*, CCYV). Существенное влияние на проведение этих тестов оказывал вариант синтеза комплементарной ДНК (кДНК). Использование наборов для проведения обратной транскрипции фирм Агродиагностика (с праймером Random (dN)6) и Евроген (с праймерами Oligo (dT)17 + Random (dN)10) имело несомненное преимущество по сравнению с использованием соответствующих наборов фирм Диалат и Синтол.

Проведение последующей вложенной ПЦР с праймерами TIC3/TIC4, специфичными к TICV и ToC5/ToC6, специфичными к ToCV, позволило эффективно подтвердить выявление изолятов TICV, но не привело к улучшению выявления изолятов ToCV.

По результатам отработки ПЦР в реальном времени констатировано, что для проведения скрининговых тестов на наличие T1CV наиболее пригодны праймеры и зонд T1CV-463F/T1CV-577R/T1CV-497P (EPPO, 2013). При проведении тестов с этими праймерами и зондом высокоспецифичное выявление изолятов T1CV наблюдалось как при использовании 1-этапного формата ПЦР-ПВ с наборами реагентов OneTube RT-PCR TaqMan (Евроген) или 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-ПВ в присутствии ROX (Синтол) с дополнительным внесением ревертазы MMLV, так и в 2-этапном формате ПЦР-ПВ с наборами реагентов qPCRMix-HS (Евроген) или 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-ПВ в присутствии ROX (Синтол). Для проведения тестов в 2-этапном формате в равной степени была пригодна кДНК, синтезированная наборами реагентов для обратной транскрипции фирм Агродиагностика, Диалат, Евроген и Синтол.

Установлено, что достаточно эффективное и специфичное выявление изолятов T1CV достигается также при использовании праймеров и зонда T1CV-370F/T1CV-435R/T1CV-395P. Их наиболее целесообразно использовать в формате 2-этапной ОТ-ПЦР-ПВ, так как при проведении тестов в 1-этапном формате возможно получение неспецифической положительной реакции с изолятами CYSDV (Shneyder et al., 2023).

Проведена отработка скринингового теста на наличие ToCV методом ПЦР-ПВ с праймерами и зондом ToCV-F/ToCV-R/T1CV-TAQ (Papaianis et al., 2011). Установлена возможность их применения в 1-этапном и 2-этапном форматах с набором реагентов 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-ПВ в присутствии ROX фирмы Синтол. Тесты с наборами реагентов OneTube RT-PCR TaqMan и qPCRMix-HS фирмы Евроген были менее эффективными. Для проведения тестов с этими праймерами и зондом в 2-этапном формате ПЦР-ПВ более целесообразно проводить синтез кДНК с наборами реагентов для обратной транскрипции фирм Диалат, Евроген и Синтол, чем с набором фирмы Агродиагностика.

В то же время констатирована относительно низкая эффективность праймеров и зондов ToCV-258F/ToCV-331R/ToCV-P и ToCV-F/ToCV-R/ToCV-P ввиду их избирательной реакции с изолятами ToCV или неспецифической реакции с

изолятами нецелевых кринивирuсов (Shneyder et al., 2023).

Заключение. Проведена отработка скрининговых тестов на наличие кринивирuсов хлороза томата и инфекционного хлороза томата методами ПЦР в «реальном времени» и вложенной ПЦР. Для проведения дальнейшей валидации избраны праймеры и зонды T1CV-463F/T1CV-577R/T1CV-497P, T1CV-370F/T1CV-435R/T1CV-395P и ToCV-F/ToCV-R/T1CV-TAQ.

Список литературы:

Живаева Т.С., Лозовая Е.Н., Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А., Приходько Ю.Н. Отработка молекулярных методов диагностики вируса пятнистого увядания томата. Защита и карантин растений. 2021. № 5. С. 32-34.

Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А. Вирус коричневой морщинистости плодов томата — потенциальная угроза для производства томатов и перца. Фитосанитария. Карантин растений. 2020. № 3 (3). С. 6-16.

Лозовая Е.Н., Приходько Ю.Н., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А. Диагностика вирусов рода Begomovirus / Фитосанитария. Карантин растений. 2023. № 1 (13). С. 23-31.

Шнейдер Ю.А., Каримова Е.В., Приходько Ю.Н., Лозовая Е.Н., Живаева Т.С. Вирусы томата, особо опасные для овощеводства России / Картофель и овощи. 2021. № 6. С. 3-8

Dovas C.I., Katis N.I. & Avgelis A.D. (2002) Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. Plant Disease, 86: 1345-1349.

EPPO (2013) PM 7/118 (1) Tomato chlorosis virus and Tomato infectious chlorosis virus. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 43: 462-470.

Lozovaya E., Prikhodko Y., Zhivaeva T., Shneyder Y. The diagnostics features of Begomoviruses in Russian Federation / Acta Horticulturae. 2021. T. 1320. С. 297-304.

Papaianis L.C., Harkou I.S., Markou Y.M., Demetriou C.N., Katis N.I. Rapid discrimination of Tomato chlorosis virus, Tomato infectious chlorosis virus and co-amplification of plant internal control using real-time RT-PCR. J. Virol. Methods, 2011; 176: 53-9.

Shneyder Y., Karimova E., Zhivaeva T., Bashkurova I., Lozovaya E., Prikhodko Y. Evaluation of the applicability of diagnostic methods for viruses of the genus Crinivirus affecting major vegetable crops / Acta Horticulturae. 2023 (в печати).

РАЗРАБОТКА НОВОГО ПЦР-ТЕСТА ДЛЯ ДИАГНОСИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛИСТОВОГО ОЖОГА ЛУКА *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*

Каракай М.В.^{1,2}, Приходько С.И.¹, Яремко А.Б.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений» ФГБУ «ВНИИКР» 140150, Быково, ул. Пограничная, д. 32

² Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва 127550 E-mail: milenalfk1f@gmail.com

Введение. Листовой ожог лука — бактериальное заболевание, вызываемое бактерией рода *Xanthomonas*, поражающей широкий спектр культурных и дикорастущих растений. Данные бактерии оказывают глобальное воздействие на торговлю семенами, растениями и продуктами питания и наносят значительный экономический и экологический ущерб. *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* входит в Единый пе-

речень карантинных объектов для стран-партнеров ЕАЭС, поражает растения рода *Allium*, характеризуется четкой органотропной специализацией. Симптомы наиболее ярко проявляются на листьях и стеблях растений в период образования луковички. При высоком уровне заражения происходит отмирание листьев и, в результате, образуются луковички меньшего размера и худшего качества, что наносит

серьезный экономический ущерб при возделывании растений рода *Allium sp.* Присутствие *Xanthomonas euvesicatoria pv. allii* в почве также может привести к снижению всхожести и энергии прорастания семян лука. Диагностика возбудителя бактериального ожога лука затрудняется разнообразием генетически близких штаммов и многочисленных патовариантов ксантомонад. Согласно имеющимся данным основными путями переноса инфекции считаются семена, зараженные растительные остатки, рассада, сельскохозяйственный инвентарий. Эффективность мер борьбы и защиты растений от бактериальных болезней сильно зависит от наличия быстрых, чувствительных и специфичных методов лабораторных исследований. Методы ПЦР имеют существенное преимущество перед другими методами, поскольку чаще всего они не требуют выделения и культивирования фитопатогенов и считаются более чувствительными и менее трудоемкими, чем культуральные методы.

Цель исследования. Целью данной работы являлась разработка специфичного и чувствительного ПЦР-теста, который бы позволил определять наличие возбудителя листового ожога в образцах лука.

Материалы и методы. Первый этап разработки ПЦР-теста заключался в подборе специфичных олигонуклеотидов, температурных режимов амплификации и состава реакционной смеси. Из пятнадцати пар праймеров, нацеленных на две мишени геномных сборок бактерий вида *X. euvesicatoria*, были отобраны две пары, подходящие для проведения молекулярно-генетического анализа методом ПЦР «в режиме реального времени» и три пары для анализа методом ПЦР с визуализацией результатов в агарозном геле. Для определения аналитической специфичности теста использовали бактерий, относящихся к родам *Xylella*, *Xanthomonas*, *Pantoea* из коллекции Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР». В качестве положительного контрольного образца был взят штамм *Xanthomonas euvesicatoria pv. allii*, изолированный с расте-

ний репчатого лука (*Allium cepa* L.) в Реюньоне (Франция) в 1996 г., депонирован во Французскую коллекцию бактерий в 2002 г. под номером CFBR 6369. Для определения аналитической чувствительности тестов использовали десятикратные предельные разведения суточной культуры *Xanthomonas euvesicatoria pv. allii*.

Результаты. В результате было подтверждено, что ПЦР-тест способен обнаружить целевой фитопатоген при бессимптомном заражении семенного и посадочного материала лука, а также исключить ложноположительные результаты.

Выводы. Новый ПЦР-тест может стать частью решения проблемы установления фитосанитарного состояния подкарантинной продукции лука. В случае установления высоких значений критериев эффективности возможности использования разработанного теста в качестве отборочного при проведении лабораторных исследований.

Список литературы:

1. Шнейденр Е.Ю., Каримова Е.В. Анализ фитосанитарного риска возбудителя листового ожога лука *Xanthomonas axonopodis pv. allii* (Roumagnac et al.) для территории Российской Федерации. — 2014 г. — 34 с.
2. EPPO diagnostic protocol PM 7/128 (1) *Xanthomonas axonopodis pv. allii*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin — 2016 — 46 (3), 429-443.
3. Kavhiza N. J.; Zargar M.; Prikhodko S. I.; Pakina E. N.; Muvingi M. Germination response of 12 onion varieties to inoculation with *Xanthomonas euvesicatoria pv. Allii* // AIP Conference Proceedings 2777, 020070 (2023)
4. Nga N.T.T., Tran T.N., Holtappels D., Ngan N.L.K., Hao N.P., Vallino M., Tien D.T.K., Khanh-Pham N.H., Lavigne R., Kamei K., Wagemans J., Jones J.B. Phage Biocontrol of Bacterial Leaf Blight Disease on Welsh Onion Caused by *Xanthomonas axonopodis pv. allii* // Antibiotics. — 2021. — №5 (10). — С. 517.
5. PM 7/128 (1) *Xanthomonas axonopodis pv. allii* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 46(3). — 2016. — С. 429-443.

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *FUSARIUM OXYSPORUM* ДЛЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Чекалин А.М., Феоктистова Н.А., Мاستиленко А.В., Богданов И.И., Ломакин А.А, Сульдина Е.В., Тойгильдин А.Л.

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина (ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ), Ульяновск, Россия

Актуальность. *Fusarium oxysporum* (*Fo*) — это видовой комплекс, включающий генетически и фенотипически разнообразные штаммы микроорганизмов, которые являются основными почвенными патогенами и возбудителями болезней экономически важных растений, которые визуализируются как увядание и последующее загнивание. Члены видового комплекса *Fo* широко распространены в почве и были идентифицированы во многих ареалах. Они, как правило, специфичны для хозяина и вызывают заболевания только у одного или нескольких родственных видов

контаминируемых растений. Однако, по литературным данным, некоторые его представители распространяются локально. Поэтому есть необходимость проведения мониторинговых исследований по детекции вышеназванных микроорганизмов в различных ареалах с учетом географической принадлежности.

Цель исследований — разработка тест-системы для идентификации возбудителей заболеваний растений, вызванных фитопатогенными грибами *Fusarium oxysporum*, на основе полимеразной цепной реакции с детекцией в

режиме «реального времени» и ее апробация на полевых штаммах.

В работе анализировали 16 штаммов *Fusarium oxysporum*, в том числе 2 депонированных штамма (*Fusarium oxysporum* VKM No. F-140, *Fusarium oxysporum* VKM No. F-143) в VKM ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований» РАН и 14 полевых штамма, предположительно обладающих способностью к биосинтезу эндополигалактуроназы (эндоПГ), выделенных из проб пшеницы и идентифицированных по методике В.И. Билай (1977) и ключу Никитинского-Алеева.

Материалы: реакционная смесь Био Мастер HS-Таг ПЦР (2х), ламинарный бокс БМБ-ii-«Ламинар-с» — 12, центрифуга/вортекс для пробирок, центрифуга-встряхиватель медицинская серии CM-50M, твердотельный термостат TDB-120, амплификатор детектирующий ДТ прайм.

Используя микроскоп, проводили исследования по изучению морфологических свойств полевых штаммов микроскопических грибов, выращиваемых 12 суток на среде Сабуро (HiMedia, Индия), среде Ниренберга (SNA), гвоздично-листовом агаре (ГЛА), картофельно-сахарозном агаре (КСА) при температуре 20 °С. Выделение ДНК из моноспоровых культур микроскопических грибов проводили, применяя набора реагентов «ЛИРА+» (Вектор Бест, РФ).

После изучения генома *Fusarium oxysporum* для разработки системы молекулярно-генетической идентификации был выбран участок генома, кодирующий эндополигалактуроназу — *Fusarium oxysporum* isolate TD586 (pg1) gene. Обоснованием его использования в настоящем исследовании было предположение, что эндополигалактуроназы (эндоПГ) (поли- α -1,4-галактуронид гликаногидролазы; ЕС 3.2.1.15) играют ключевую роль в патогенности грибов для растений путем деполимеризации гомогалактуронана — основного компонента клеточной стенки растений.

Множественное выравнивание используемого гена проводили в Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 и UGENA 44.0. Подбор и дизайн праймеров был проведен с помощью ресурса NCBI BLAST-primer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), программы UGENA

44.0. Подбор зонда проводили в программах UGENA 44.0 и Oligoevaluator ресурс (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>).

Выводы. Авторами была разработана оригинальная тест-система для детекции *Fusarium oxysporum* методом ПЦР-РВ на основании использования специфического участка генома, кодирующего эндополигалактуроназу, состоящая из прямого праймера (f) 5'-3' GGGATCTGGGAGTACGGTTGC и обратного праймера (r) 3'-5' CCTACAGGCAGCGTTGAAGC, флуоресцентного зонда ROX GCTATTGCGGCTTTGCTGC BHO2 (оптимальная концентрация — 0,4 pM). Протокол постановки реакции включает предварительную денатурацию — 95 °С — 5 минут (1 цикл); денатурацию — 95 °С — 5 сек, отжиг — 60 °С — 15 сек (50 циклов). Метод оценки результатов постановки реакции с применением порогового уровня (Ct) был изменен на методику прямого сравнения графиков накопления флуоресцентного сигнала с учетом первой и второй производной (Cp). Замена позволила исключить в реакции неоднородность расчета коэффициента пропорциональности количества ДНК к уровню сигнала флуоресценции. Так же был произведен подбор оптимальной концентрации праймеров и изучена их специфичность. Нами были взяты следующие концентрации праймеров: 7 pM, 8 pM, 9 pM, 10 pM каждого на реакцию. Эмпирически было установлено, что увеличение концентрации праймеров не влияет на эффективность реакции, поэтому в наших дальнейших исследованиях были использована концентрация 9 pM каждого праймера на реакцию.

В результате изучения чувствительности подобранного протокола для идентификации *Fusarium oxysporum* методом ПЦР-РВ с детекцией по каналу ROX составила 10³ геномов. Разработанная тест-система была с положительным результатом апробирована на 14 полевых штаммах и 2 референс-штаммах.

Исследование выполнено согласно тематическому плану-заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, регистрационный номер ЕГИСУ НИ-ОКТР 122030200367-8.

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ ФИТОПЛАЗМ, ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ В РОССИИ, ОПРЕДЕЛЕННАЯ НА ОСНОВАНИИ ГЕНА 16S рРНК

Кастальева Т.Б., Гирсова Н.В., Богоутдинов Д.З.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии (ФГБНУ ВНИИФ РАН), Большие Вязёмы, Россия

Один из наиболее важных этапов в изучении патогена — установление его таксономической принадлежности. Фитоплазмы — это облигатные патогены, бактерии класса Mollicutes, лишённые клеточной стенки. Размножаясь в клетках сосудистой системы высших растений, фитоплазмы вызывают болезни, связанные с поражением вегетативных и генеративных органов, нередко приводящие к стерильности или гибели отдельных частей и всего растения. Проявляя крайне высокую степень паразитизма, эти бактерии утратили некоторые метаболические пути

синтеза жизненно необходимых веществ и, как следствие, утратили способность расти на бесклеточных питательных средах, что затрудняло возможность их дифференцировать и классифицировать. Проблема классификации фитоплазм была решена лишь через четверть века после их открытия, в начале 1990-х гг., когда исследователи обратили внимание на консервативный ген, кодирующий 16S рРНК, и стали использовать универсальные и специфические праймеры для его амплификации. Филогенетический анализ на основе этого гена показал, что фитоплаз-

мы образуют большую обособленную монофилетическую группу — кладу — внутри класса Mollicutes. Это открыло новые возможности для разработки классификации этих организмов [1, 2]. В 2022 году сообщалось о наличии 37 групп, более 150 подгрупп фитоплазм [3].

Методы. Суммарную ДНК экстрагировали из предварительно замороженных или высушенных жилок растений, очищали с использованием коммерческих наборов или стандартной методики. Фрагмент 16S рДНК амплифицировали в ПЦР с праймерами P1/16Sr-SR. Полученный ПЦР-продукт (1.8 Kb) служил матрицей для синтеза ампликона 1.2 Kb с праймерами R16F2n/R16R2. Для определения принадлежности фитоплазмы к группе / подгруппе использовали метод анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ). Ампликон ДНК подвергали действию эндонуклеаз рестрикции. Фрагменты ДНК анализировали электрофорезом в 5% ПААГ [1].

Результаты. За 17 лет, в течение которых во ВНИИФ проводилась работа по обнаружению и идентификации фитоплазм в самых разнообразных продовольственных культурах (картофель, бобовые, злаковые, овощные, кормовые, технические, плодовые, ягодные, декоративные), а также в дикорастущих травянистых, в том числе сорных,

в древесных цветковых и голосеменных растениях, патоген был обнаружен более чем у 130 самых разных видов растений. Всего за эти годы обнаруженная фитоплазма принадлежала к 10 таксономическим группам (16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVI, 16SrIX, 16SrX, 16SrXII, 16SrXIV и 16SrXXI) и 13 подгруппам. Однако наибольшее распространение имели фитоплазмы четырех групп: 16SrI, 16SrIII, 16SrVI и 16SrXII. Эти фитоплазмы были выявлены среди 122 видов растений в количестве 43, 50, 29 и 50 видов для 16SrI, III, VI и XII групп соответственно. В 85 видах растений была обнаружена фитоплазма, принадлежащая только к одной из этих четырех групп, в 37 видах — фитоплазмы, принадлежащие, по крайней мере, к двум группам. Последние представлены в Таблице. В растениях вида донник белый, картофель, одуванчик лекарственный и перец стручковый выявлены фитоплазмы каждой из четырех групп. Фитоплазмы остальных шести групп обнаруживались не более, чем на одном-трех видах растений. Так, фитоплазмой группы 16SrII были инфицированы опунция и черныбыльник, фитоплазмой группы 16SrV — вяз, граб и ольха, 16SrX — яблоня и слива. В пшенице выявлена фитоплазма 16SrIX, в мятлике 16SrXIV, в сосне обыкновенной и горной — фитоплазма группы 16SrXXI.

ТАБЛИЦА. ВИДЫ РАСТЕНИЙ, КОТОРЫЕ БЫЛИ ХОЗЯЕВАМИ ФИТОПЛАЗМ, ПРИНАДЛЕЖАВШИХ К ДВУМ И БОЛЕЕ ГРУППАМ

Видовое название растения-хозяина	Принадлежность фитоплазмы к группе			
	16SrI	16SrIII	16SrVI	16SrXII
<i>Aesculus hippocastanum</i> L. Каштан конский		+		+
<i>Artemisia absinthium</i> L. Полынь горькая			+	+
<i>Artemisia dracunculoides</i> L. Полынь эстрагонная	+		+	
<i>Beta vulgaris</i> L. subsp. <i>vulgaris</i> . Свекла сахарная	+			+
<i>Bromus inermis</i> Leyss. Костёр безостый	+			+
<i>Campanula glomerata</i> L. Колокольчик сборный	+		+	
<i>Capsicum annuum</i> L. Перец стручковый	+	+	+	+
<i>Chamaenerion angustifolium</i> (L.) Scop. Кипрей узколистый	+	+		
<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop. Бодяк полевой	+	+	+	
<i>Convolvulus arvensis</i> L. Вьюнок полевой	+	+		+
<i>Coriandrum sativum</i> L. Кориандр посевной	+			+
<i>Daucus carota</i> (Hoffm.) Arcang. Морковь посевная			+	+
<i>Fragaria x ananassa</i> (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier. Земляника ананасная		+	+	
<i>Fraxinus excelsior</i> L. Ясень обыкновенный	+	+		
<i>Fraxinus pennsylvanica</i> Marsh. Ясень пенсильванский.	+	+		
<i>Lonicera tatarica</i> L. Жимолость татарская	+		+	
<i>Lotus corniculatus</i> L. Лядвенец рогатый	+	+		
<i>Lupinus polyphyllus</i> Lindl. Люпин многолистный	+	+		
<i>Medicago lupulina</i> L. Люцерна хмелевидная	+	+		
<i>Medicago sativa</i> — L. Люцерна посевная		+	+	+
<i>Melilotus albus</i> Medik. Донник белый	+	+	+	+
<i>Petunia x hybrida hort. ex E Vilm.</i> Петуния гибридная		+		+

<i>Prunus subg. cerasus</i> (Mill.) A. Gray. Вишня обыкновенная	+			+
<i>Rubus idaeus</i> L. Малина обыкновенная		+	+	
<i>Securigera varia</i> (L.) Lassen. Вязель пёстрый	+			+
<i>Solanum lycopersicum</i> L. Томат	+		+	+
<i>Solanum tuberosum</i> L. Картофель	+	+	+	+
<i>Sonchus arvensis</i> L. Осот полевой		+	+	
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill. Звездчатка средняя		+	+	
<i>Taraxacum officinale</i> Wigg. Одуванчик лекарственный	+	+	+	+
<i>Trifolium hybridum</i> L. Клевер гибридный	+	+	+	
<i>Trifolium medium</i> L. Клевер средний		+		+
<i>Trifolium pratense</i> typus. Клевер луговой —	+	+		
<i>Trifolium repens</i> L. Клевер ползучий (белый)	+	+		
<i>Ulmus parvifolia</i> Jacq. Вяз мелколистный	+			+
<i>Vicia faba</i> var. equine. Боб конский		+	+	
<i>Vicia sepium</i> L. Горошек заборный	+		+	

Литература. 1. Duduk B., et al. In *Phytoplasma: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* / M. Dickinson, J. Hodgetts (eds.). Humana Press, 2013. 938: 159-170. 2. Schneider, B. et al. In *Moleculur and Diagnostic*

Procedures in Mycoplasmology / R. Razin & J. G. Tully (eds.). San Diego: Academic Press, 1995, l: 369-380. 3. Wei, W., Zhao, Y., *Phytoplasma Taxonomy: Nomenclature, Classification, and Identification. Biology*, 2022, 11: 1119.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СОЕВОЙ ЦИСТООБРАЗУЮЩЕЙ НЕМАТОДЫ *HETERODERA GLYCINES*

Иванов А.В.¹, Бондаренко Г.Н.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений» ФГБУ «ВНИИКР», Московская область, Россия

² ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Широко распространённая культура сои, возделываемая преимущественно в Юго-Восточной Азии, в последнее время популярна в США, Бразилии, Аргентине, Китае и в России. Урожайность сои в значительной степени зависит от уровня повреждения соевой цистообразующей нематодой *H. glycines* Ichinohe 1952, которая наносит ущерб урожаю (Ichinohe, 1952). Впервые о ней сообщили в Японии в 1915 г., затем в Корею в 1936 г., в Маньчжурии — 1938 г., в США — 1954 г. Обеспечение получения высококи урожаяев сои, является актуальной задачей науки и производства. В связи с чем необходимо ежегодно проводить фитосанитарный мониторинг распространения соевой нематоды *H. glycines* и совершенствование методов диагностики. Быстрая и точная идентификация нематоды имеет решающее значение для предотвращения потери урожая и принятия своевременных решений по борьбе с этим вредителем.

Морфологическая идентификация рода *Heterodera* может быть затруднена из-за сложной таксономии, поскольку взрослые особи имеют половой диморфизм, различия между многими видами малозаметны, а для точной идентификации и разграничения видов часто требуется несколько стадий жизненного цикла (Subbotin et al., 2002). Таким образом, данные о молекулярной последовательности стали важной частью диагностики в этой группе и привели к внедрению молекулярных методов диагностики и дифференциации видов. База общедоступных данных о последовательностях значительно выросла за последнее время, и более половины всех известных видов *Heterodera* были охарактеризованы с использованием одного или нескольких молекулярных маркеров, обычно используемых для штрих-кодирования ДНК (18S, внутренний транскрибируемый спейсер ITS, 28S, COI).

Молекулярная идентификация соевой цистообразующей нематоды *Heterodera glycines* выполняется с помо-

щью классической ПЦР, которая занимает много времени, требует сложной организации лаборатории, специальных методов и знаний. В 2000 году компания Eiken Chemical Company Ltd. разработала новый метод амплификации нуклеиновых кислот, названный петлевой изотермической амплификации (LAMP) (Notomi et al., 2000). LAMP — это метод амплификации нуклеиновой кислоты с использованием от четырех до шести специально разработанных праймеров, на основе 6–8 различных участков целевой ДНК в изотермических условиях (60–65 °C), с получением большего количества продуктов за короткое время (от 30 до 60 минут). Анализ LAMP имеет ряд преимуществ, являясь не только быстрым и чувствительным, но также эффективным и экономичным в практическом применении. Благодаря своей скорости, надежности и простоте использования LAMP внедряют для диагностики фитопатогенов. Кроме того, анализы на основе LAMP разработаны для обнаружения нескольких паразитических нематод растений, таких как *Aphelenchoides besseyi*, *A. ritzemabosi*, *Anguina wevelli* и *A. agrostis*, *Radopholus similis*, непосредственно из тканей инфицированных растений, *Ditylenchus destructor* из сложных смесей ДНК растений и нематод *Tylenchulus semipenetrans* в образцах почвы.

Цель исследования. Целью настоящего исследования — разработка LAMP-теста для *Heterodera glycines* для использования в рутинной диагностике, поскольку быстрая идентификация позволит быстро и качественно выявлять и дифференцировать целевой вид.

Материалы и методы исследований. Для анализа молекулярными методами были отобраны цисты *Heterodera glycines*, содержащие жизнеспособные яйца и личинки, так как это гарантирует достоверный результат. При проведении исследований, были использованы следующие праймеры: TW 81 (5'-GTT-TCCGTAGGTGAACCTGC-3') AB 28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'), которые амплифицируют фрагмент 1060 п.н. ITS rDNA. Амплифицированные продукты ПЦР разделяли электрофорезом в агарозном геле и расшифровывали нуклеотидную последовательность методом Сэнгера. Оригинальные последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) вида *Heterodera glycines* и последователь-

ности рода *Heterodera*, полученные из базы данных NCBI GenBank, использованы для построения филогенетического дерева. Все последовательности выравнивали с использованием программы Bioedit (v.7.0). На сегодняшний день ITS используется для идентификации и филогенетических целей наиболее широко, так как это единственная область гена, для которой доступны последовательности, способные охарактеризовать наибольшее количество видов *Heterodera*. Построение филогенетического дерева рода *Heterodera* проводили в программе MEGA 7 методом максимального правдоподобия.

Результаты и выводы. Последовательность ITS была выбрана в качестве кандидата-мишени для дизайна праймеров LAMP. Оригинальную последовательность ITS *Heterodera glycines* использовали в качестве заправки для анализа в базе данных NCBI GenBank, затем загружали извлеченные последовательности *Heterodera glycines* и родственных видов и сравнивали путем множественного выравнивания последовательностей с использованием программы Bioedit (v.7.0).

В общей сложности 10 наборов праймеров были результатом применения онлайн-инструмента LAMP Primer Explorer V5 (Eiken Chemical Co, Ltd, Токио, Япония) к фрагменту последовательности *Heterodera glycines*. Из-за частичного сходства последовательностей у близких видов *Heterodera* только два набора праймеров выбраны для дальнейшего анализа, а после проверочных исследований использовался только один. Каждый из наборов состоял из двух внешних праймеров (F3 и B3), одного прямого внутреннего праймера (FIP), содержащего на 3'-конце участок F2, а на 5'-конце участок F1с и одного обратного внутреннего праймера (BIP), содержащего на 3'-конце участок B2, а на 5'-конце участок B1с. Пара внешних праймеров LAMP F3/B3 использовалась для подтверждения того, что LAMP амплифицирует правильную мишень.

В данной работе дана разработка анализа на основе LAMP для специфической идентификации *Heterodera glycines* путем нацеливания на последовательность ITS. Этот метод не только более быстрый, простой и доступный, но еще и точный, чем традиционные методы диагностики.

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ (*FRAGARIA ANANASSA*) С ЦЕЛЬЮ СОРТОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Тарасова Е.В.

Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства (ФГБНУ ФНЦ Садоводства), Москва, Россия

Введение. Одной из самых распространенных в России ягодных культур является земляника садовая. В связи с высокой потребностью в данной культуре, количество сортов земляники садовой растет с каждым годом. Однако вместе с этим возникает необходимость быстрой и точной идентификации сортов, чего сложно

достичь простым описанием фенотипических признаков. Наиболее перспективным и широко используемым методом сортовой идентификации ягодных культур является метод SSR-маркирования, основанный на изучении ДНК-полиморфизма микросателлитных локусов (Хлесткина, 2013).

Актуальность. В связи с непрерывным процессом создания новых сортов земляники садовой и их высоким фенотипическим сходством, изучение генетического полиморфизма для сортовой идентификации представляет особую актуальность.

Цель и задачи. Целью данного исследования являлся подбор микросателлитных локусов для эффективной идентификации сортов земляники садовой селекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства.

В задачи исследования входили апробация подобранных по литературным источникам SSR-праймеров на сортах земляники селекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства, а также составление уникальных генетических профилей данных сортов по наиболее полиморфным локусам.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись наиболее перспективные сорта земляники садовой из коллекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства. Выделение ДНК из тканей листьев растений проводилось с использованием модифицированного ЦТАБ-метода (Генная инженерия растений, 1991).

Для анализа были выбраны микросателлитные локусы, рекомендованные для сортовой идентификации и паспортизации земляники садовой в ряде литературных источников (Sargent et al., 2008; Levers et al., 2005; Chambers et al., 2013).

Определение длины ПЦР-продуктов производилось с использованием генетического анализатора Нанофор 05 производства НПО «Синтол».

Основные результаты. Все праймеры были протестированы на исследуемых сортах земляники садовой, при этом получены хорошо различимые на электрофоретическом профиле продукты амплификации, соответствующие ожидаемому размеру.

Выбранные для анализа микросателлитные локусы характеризовались высоким уровнем полиморфизма и позволяли получить уникальные генетические профили для исследуемых сортов земляники садовой.

Всего протестировано 12 пар праймеров для фрагментного анализа на ряд SSR-локусов: EMFv104, UFFa3D11, ARSFL9, CFACT152, ARSFL11, EMFax380097, FG2, CFACT110, FG7cd, EMFn170, EMFvi136, EMFn121.

Количество аллелей на локус варьировалось от 7 до 19, и в среднем составило 11 аллелей на локус.

Заключение. В результате проведенных исследований по всем использованным праймерам получены уникальные генетические профили, позволяющие эффективно проводить сортовую идентификацию сортов земляники садовой.

Список использованной литературы.

Chambers A., Carle S., Njuguna W., Chamala S., Bassil N., Whitaker V.M., Barbazuk W. B., Foltá K.M. A genome-enabled, high-throughput, and multiplexed fingerprinting platform for strawberry (*Fragaria L.*) *Mol Breeding* (2013) 31:615–629;

Lewers K. S., Styan S. M. N., Hokanson S. C. 2005. Strawberry GenBank-derived and genomic simple sequence repeat (SSR) markers and their utility with strawberry, blackberry, and red and black raspberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130 (1): 102–115;

Sargent D., Cipriani G., Vilanova S., Gil-Ariza D., Arus P., Simpson D.W., Tobutt K. R., Monfort A. 2008. The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference map. *Genome*, 51 (2): 120–127;

Sargent, D.J., Passey, T., Surbanovski, N., et al. 2012. A microsatellite linkage map for the cultivated strawberry (*Fragaria times ananassa*) suggests extensive regions of homozygosity in the genome that may have resulted from breeding and selection, *Theor. Appl. Genet.*, 124, 1229–40;

Генная инженерия растений: Лабораторное руководство. Пер. с англ. / Дж. Дрейпер, Р. Скотт, Ф. Армидж, Р. Уолден [Под ред. Дж. Дрейпера]. М.: Мир, 1991. 408 с.

Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. №4/2. С. 1044–1054.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ И МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНОЙ СТРУКТУРЫ ФИТОПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ ВИНОГРАДА НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Бондаренко Г.Н.¹, Мурашова Е.К.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений» ФГБУ «ВНИИКР» 140150, Быково, ул. Пограничная, д. 32

² Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва 127550 E-mail: e.murashova2017@mail.ru

Введение. Виноградарство и виноделие играют ключевую роль в экономике южных регионов Российской Федерации и являются неотъемлемой частью российского агропромышленного комплекса. По итогам 2022 года общая площадь виноградников составила 100,8 тыс га, из них 70 тыс. плодоносящие. Было заложено 6,9 тыс. га молодых виноградников. Фитосанитарный контроль растений винограда необходим для предотвращения распростра-

нения вирусных заболеваний при расширении мирового рынка виноградарства. Вирусные заболевания влияют на технологические характеристики, приводят к значительным потерям урожая, сокращению производства и снижению долговечности растений винограда.

Цель исследования. Настоящее исследование по изучению распространения вирусных инфекций на винограде позволит дать наиболее полную оценку их фи-

тосанитарному состоянию, так как на данный момент в России, и в частности в Республике Крым, было проведено ограниченное число исследований на виноградниках с целью определения видового состава вирусов, их распространенности и тяжести вирусных заболеваний. Изучаемые объекты относятся к родам *Nepovirus* и *Ampelovirus*. Геном неповирусов представлен двумя сегментами одноцепочечной РНК позитивной полярности, обозначаемых РНК-1 (7200-8400 н.о.) и РНК-2 (3700-7200 н.о.). Оба генетических сегмента ковалентно связаны на 5'-конце с белком VPg (2-4 кДа), а 3'-конец полиаденилирован. Вирусы рода *Ampelovirus* имеют гибкую и нитевидную геометрию. Диаметр составляет около 10-13 нм, длина 1400-2200 нм. Геномы линейные, длиной около 17,9 кб., кодируют 13 белков.

Материалы и методы. В ходе работы был проанализирован растительный материал, полученный из действующих производственных виноградников на территории Российской Федерации (Республики Крым и Дагестан). Для скрининга методом ОТ-ПЦР использовались две пары праймеров GFLV3135F/GFLV3692R и LR3-CP107F/LR3-CP407R (Xiao et al.). Продукты ПЦР были проанализированы на 1,5%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Результаты подтверждал с помощью секвенирования методом Сэнгера.

Результаты. Проанализировано 200 образцов из Республики Крым, 20 образцов — Республики Дагестан и более 50 образцов импортного посадочного материала. По результатам анализов методом ПЦР выявлены целевые виды

вирусов короткоузлие винограда Grapevine fanleaf virus и вируса скручивания листьев винограда Grapevine leafroll-associated virus 1 [3]. Grapevine fanleaf virus относится к роду *Nepovirus*. Grapevine leafroll-associated virus 1 принадлежит к роду *Ampelovirus*. Определено, что вирозам подвержены основные сорта: Каберне-Совиньон и Мускаты.

Выводы. Стоит отметить, что необходимо обследование маточников, питомников и производственных виноградников на комплекс вирусов для оценки инфекционного фона. Оптимизация методов диагностики позволит окончательно определить фитосанитарный статус вирозов на территории винодельческих регионов.

Список литературы:

1. Какарека Н.Н., Козловская З.Н., Волков Ю.Г., Плешакова Т.И., Сапоцкий М.В., Щелканов М.Ю. Неповирусы (Picornvirales, Secoviridae, Nepovirus) на юге Дальнего Востока: результаты многолетнего мониторинга // Юг России: экология, развитие. 2017. Т.12, N4. С.105-119. DOI: 10.18470/1992-1098-2017-4-105-119
2. Huogen Xiao, Mehdi Shabanian, Clayton Moore, Caihong Li and Baozhong Meng Survey for major viruses in commercial Vitis vinifera wine grapes in Ontario // Virology Journal (2018) 15:127
3. Pacifico, D., Caciagli, P., Palmano, S., Mannini, F., Marzachi, C. Quantitation of Grapevine leafroll associated virus-1 and -3, Grapevine virus A, Grapevine fanleaf virus and Grapevine fleck virus in field-collected Vitis vinifera L. 'Nebbiolo' by real-time reverse transcription-PCR. J. Virol. Methods 2011, 172, 1-7.

БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА МОРДОВНИКА ШАРОГОЛОВОГО ПО ОТНОШЕНИЮ К ВОЗБУДИТЕЛЮ БУРОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ГНИЛИ

Доморацкая Д.А.^{1,2}, Раменскова М.В.²

¹ ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р.п. Быково, Россия

² ФГБОУ ВО РГАУ — МСХА имени К. А. Тимирязева, Москва, Россия

Актуальность. Бурая бактериальная гниль картофеля вызывается опасным карантинным фитопатогеном *Ralstonia solanacearum*, поражающим большое количество растений-хозяев. Поиск новых способов профилактики этого заболевания является весьма актуальной проблемой на сегодняшний день.

Цель. Целью работы было исследовать экстракт мордовника шароголового (*Echinops sphaerocephalus*) на предмет его бактериостатических свойств по отношению к *Ralstonia solanacearum*.

Методы. В работе были использованы следующие методы: экстрагирование вторичных метаболитов мордовника шароголового n-гексаном, посев культуры *R. solanacearum* на плотную общую среду YPGA пуассонером, посев культуры *R. solanacearum* в жидкую общую среду, ПЦР в реальном времени, культурально-морфологический метод идентификации и учета.

Результаты. В результате исследования были получены следующие результаты: при внесении экстракта мор-

довника шароголового, ресуспензированного в 96% этаноле, на плотную среду в концентрации 5 мг/мл визуально был замечен замедленный рост колоний по сравнению с контролем без внесения и контролем со внесением 96% спирта. При посеве в жидкую среду с внесением экстракта мордовника шароголового в концентрации 5 мг/мл при проверке с помощью ПЦР в реальном времени ориентировочная концентрация клеток в варианте с внесением снизилась в 10-20 раз по сравнению с контролем без внесения и контролем со внесением 96% спирта.

Выводы. На основании нашего исследования можно сделать вывод, что мордовник шароголовый имеет перспективы в применении в качестве бактериостатического средства для контроля распространения *Ralstonia solanacearum*, но необходимы дальнейшие работы по установлению химического состава экстракта и отработки методов экстракции для получения наиболее эффективной вытяжки.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПШЕНИЦЫ

Гирсова Н.В.¹, Кастальева Т.Б.¹, Аблова И.Б.², Беспалова Л.А.², Джавахия В.Г.¹

¹ Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии (ФГБНУ ВНИИФ), Московская область

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко» (ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко)

Актуальность. Вирусные болезни злаковых культур известны довольно давно [1]. Долгое время считалось, что наблюдаемые симптомы не имеют инфекционную этиологию. Однако по мере развития методов диагностики была показана вирусная природа этих симптомов, определены способы распространения болезней и структурные особенности различных патогенов [2]. Диагностика вирусных болезней зерновых, основанная на симптомах пораженных растений, не всегда надежна. Она требует использования инструментальных методов идентификации патогенов. Наиболее надежными подходами в данном случае являются методы молекулярной идентификации возбудителей, основанные на анализе структуры вирусного генома с использованием различных модификаций полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Целью работы было провести диагностику образцов пшеницы с симптомами, похожими на вирусную инфекцию, собранных в Южных регионах Европейской части России.

Образцы озимой пшеницы с признаками вирусного поражения были собраны в Краснодарском и Ставропольском краях и Ростовской области и поступили во ВНИИФ. Всего было 19 образцов растений и 4 образца изолированных листьев, итого в работе было 23 образца.

Методы. Выделение суммарной РНК проводили с помощью набора реагентов «ФитоСорб» (фирма «Синтол»). Далее проводили ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров на каждый из перечисленных вирусов.

Результаты. Анализ симптомов пораженных растений (штриховатая мозаика листьев, пожелтение листьев, карликовость растений) позволил предположить, что растения могли быть заражены каким-либо из следующих вирусов: вирус полосатой мозаики пшеницы (ВПМП), вирус желтой карликовости ячменя (ВЖКЯ), вирус желтой карликовости злаков (ВЖКЗ), вирус мозаики костра (ВМК), вирус мозаики пшеницы, передающийся почвой (ВМП(П)). Из двадцати трех проанализированных образцов двадцать один образец был заражен вирусом полосатой мозаики пшеницы (ВПМП) [3]. Кроме того, некоторые образцы были одновременно заражены несколькими вирусами. Пятнадцать образцов из двадцати трех оказались заражены вирусом желтой карликовости злаков (ВЖКЗ), десять образцов были заражены вирусом мозаики костра (ВМК), два образца — вирусом желтой карликовости ячменя (ВЖКЯ) [4]. Ни в одном из образцов не был обнаружен вирус мозаики пшеницы, передающийся почвой (ВМП(П)).

Рассмотрим свойства наиболее часто встречающихся в исследованных образцах пшеницы. Полосатая моза-

ика пшеницы. Возбудитель заболевания — вирус полосатой мозаики пшеницы (ВПМП) — Wheat streak mosaic virus (WSMV) из рода Tritimovirus (Rymovirus), семейства Potyviridae. Вирионы нитевидные 700×16 18 нм. Заболевание распространено во всех регионах мира, где выращивается пшеница. Впервые описано в 30 гг. в США, в СССР идентифицировано в 1963 г. в Краснодарском крае во время массовой эпифитотии на озимых злаках, начавшейся в 1961 г., а в Куйбышевской области — в 1970 г. В 1970–1992 гг. распространение заболевания в Кинельском районе составляло от 1% до 12%, в среднем — 3%. В 21 веке распространённость заболевания в среднем составляет 5%. Урожай, при этом, снижается на 18–65%.

Выводы :

1. Полученные данные позволяют сделать заключение, что основной причиной массового поражения озимой пшеницы в южных областях Европейской части РФ был вирус полосатой мозаики пшеницы (ВПМП), передающийся клещами. Этот вирус, кроме пшеницы, поражает многие зерновые и злаковые растения: ячмень, овес, кукурузу, просо, коoster, мятлики и т.д. Из дикорастущих злаковых трав более 40 видов восприимчивы к ВПМП и являются резервуарами вируса в природе и кормовыми растениями клеща-переносчика вируса.

2. В зерносеющих районах России и ранее отмечалось постоянное присутствие вирусов полосатой мозаики пшеницы (ВПМП); желтой карликовости ячменя (ВЖКЯ), желтой карликовости злаков (ВЖКЗ), вируса мозаики костра (ВМК), вируса мозаики пшеницы, передающегося почвой (ВМП(П)). Накопление инфекции происходит постоянно, и при благоприятных погодных условиях и наличии достаточного количества насекомых-переносчиков фитопатогенов могут возникнуть эпифитотийно опасные ситуации.

Литература:

1. Развязкина, Г.М. Вирусные заболевания злаков. ред. В.Г. Рейфман. — Новосибирск: «Наука», Сибирское отделение, 1975. — 291 с.

2. Глинушкин, А.П., Райов А.А., Белошапкина О.О. Практические аспекты вирусологического обследования озимой пшеницы на Южном Урале [Электронный ресурс] Аграрный вестник Урала. — 2013. — №7 (113). — С. 4–7. — Режим доступа: <http://cyberleninka.ru/article/n/prakticheskie-aspekty-virusologicheskogo-obsledovaniya-ozimoy-pshenitsy-na-yuzhnomurale>.

3. Развязкина, Г.М., Проценко А.Е. Полосатая мозаика пшеницы. Природа. — 1963. — №7. — С. 115.

4. Можаяева К.А., Кастальева Т.Б., Гирсова Н.В. Вирус желтой карликовости ячменя и другие вирусы зерновых культур на территории Российской Федерации М.: Росинформагротех, 2007. — 32 с.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ СЕЛЕКЦИИ ФГБНУ ФНЦ САДОВОДСТВА ДЛЯ ПАСПОРТИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ

Гузеева А.А., Капитова И.А.

Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, Москва, Россия

Резюме. Для паспортизации сортов смородины черной в первые проведена оценка генетического разнообразия 12 сортов смородины черной селекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства с помощью SSR-маркеров. По результатам оценки на каждый сорт смородины черной получен свой уникальный генетический профиль, выявлены пять уникальных генотипов. Исследован биохимический состав плодов смородины черной на семь показателей, которые позволяют оценить уровень содержания полезных веществ. Полученные данные по оценке генетического разнообразия и биохимического состава смородины черной позволяют провести паспортизацию 12 сортов смородины черной селекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства и рекомендовать молекулярно-генетический метод для оценки генетического разнообразия смородины черной.

Введение. Черная смородина (*Ribes nigrum* L.) важная ягодная культура не только в России, но и в мире. В селекции смородины черной задействовано 28 видов и разновидностей рода *Ribes* L., которые можно отнести к 43 генетическим группам, из них в качестве исходного материала в селекции сортов наиболее широко задействовано только 10-12 видов [1]. Знание генетического родства позволяет более целенаправленно подбирать пары для скрещивания, создавать генетически разнообразные сорта, которые отличаются более высокой адаптивностью [2]. В настоящее время методы селекции растений существенно пополнились современными методами молекулярной биологии, такими как применение биохимических и молекулярно-генетических маркеров [3-4]. Оценка генетического разнообразия и биохимического состава смородины черной позволяет провести идентификацию и паспортизацию сорта, защитить коммерческие и правовые интересы авторов и оригинаторов сортов.

Цель и задачи. Цель научного исследования оценка генетического разнообразия и биохимического состава 12 сортов смородины черной селекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства с помощью современных методов анализа для дальнейшего использования в практической селекции, защиты правовых и коммерческих интересов учреждения-оригинатора и авторов сортов. Задачи исследований определить состав аллелей локусов микросателлитных последовательностей 12 сортов смородины черной, определить уникальные генотипы, разработать методику для паспортизации смородины черной. Оценить биохимический состав 12 сортов смородины черной и выделить сорта, имеющие высокий уровень содержания полезных веществ.

Материалы и методы. На первом этапе исследований выделена растительная ДНК из листьев смородины черной от 12 новых перспективных сортов (Бармалей, Брянский Агат, Дебрянск, Миф, Чародей, Гамаюн, Стрелец, Вера, Кудесник, Фаворит, Каскад, Подарок Ветеранам) селекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства по методике, предложенной D. Puchooa

для растительного материала с высоким содержанием полифенольных соединений с модификациями. На втором этапе проведен ПЦР анализ с применением специфических праймеров к семи микросателлитным локусам (g1-k04, g1-M07, e1-001, g2-G12, e3-B02, g1-E03, g1-B02). На третьем этапе проведен анализ продуктов амплификации на ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, который работает по принципу капиллярного электрофореза и позволяет разделить фрагменты, различающиеся по размеру на одну пару нуклеотидов. Для оценки биохимического состава в плодах смородины черной определяли содержание: антоцианов, триглицеридов, каротиноидов, аскорбиновой кислоты, пектинов, сухих растворимых веществ, суммы сахаров. Определение антоцианов, триглицеридов и каротиноидов проводили с помощью метода ВЭЖХ, аскорбиновой кислоты по ГОСТ, определение пектинов методом титрования, сухих растворимых веществ рефрактометрическим методом, суммы сахаров перманганатным методом по ГОСТ.

Основные результаты. Использование семи SSR маркеров для изучения генетического разнообразия рода *Ribes* L. выявило высокий уровень полиморфизма. Идентифицированы фрагменты ДНК специфичные для отдельных сортообразцов. В результате оценки генетического разнообразия 12 сортов смородины черной с помощью семи SSR — маркеров на каждый сорт смородины был получен свой уникальный генетический профиль, были выявлены пять уникальных генотипов. Уникальные генотипы были получены с помощью 5 SSR-маркеров (g2-G12, g1-k04, g1-E03, e1-001, g1-M07) в пяти сортах смородины черной (Бармалей, Брянский агат, Дебрянск, Чародей, Подарок Ветеранам), которые могут быть использованы в практической селекции. Полученные данные позволяют проводить оценку генетического разнообразия с помощью молекулярно-генетического метода анализа SSR-маркеров. По результатам оценки биохимического состава ягод смородины черной были выделены сорта Чародей, Каскад, Дебрянск, Брянский Агат, Стрелец, Вера, Фаворит, Гамаюн, Кудесник, Бармалей, Миф, Подарок Ветеранам, имеющие высокий уровень содержания полезных веществ и может быть использовано в практической селекции и паспортизации растений.

Заключение/выводы. Впервые был использован молекулярно-генетический метод для оценки генетического разнообразия 12 новых перспективных сортов смородины черной селекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства. На основании полиморфизма молекулы ДНК, выявленного с помощью семи SSR-маркеров охарактеризовано генетическое разнообразие 12 сортов смородины черной селекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства. Получены уникальные генотипы с помощью 5 SSR-маркеров в пяти сортах смородины черной (Бармалей, Брянский агат, Дебрянск, Чародей, Подарок Ветеранам), которые могут быть использованы в практической

селекции. По результатам оценки биохимического состава ягод смородины черной выделены 12 сортов с высоким уровнем содержания полезных веществ, которые могут быть использованы в практической селекции и паспортизации растений. Полученные данные о генетическом разнообразии и биохимическом составе смородины черной позволяют провести паспортизацию 12 сортов смородины черной из коллекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства.

Список использованной литературы/References

1. Brennan, R. The development of a genetic linkage map of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and the identification of regions associated with key fruit quality and agronomic

traits / R. Brennan, L. Jorgensen et al. // *Euphytica*. — 2008. V. 161. — P. 19-34.

2. Князев, С. Д. Достижения в селекции и основные направления совершенствования сортимента смородины чёрной во ВНИИСПК / С.Д. Князев, А.Ю. Андрианова // Достижения науки и техники АПК. — 2010. — № 4. — С. И –13.

3. Чесноков, Ю. В. ДНК — фингерпринтинг и анализ генетического разнообразия у растений / Ю.В. Чесноков // С.-х. биол. — 2005. — № 1. — С.20– 40.

4. Francia, E. Marker assisted selection in crop plants / E. Francia, G. Tacconi et al.// *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. — 2005. — V.82. — P.317-342.

ENHANCING DETECTION AND IDENTIFICATION METHODS OF *CURTOBACTERIUM FLACCUMFACIENS* PV. *FLACCUMFACIENS* ((HEDGES) COLLINS & JONES) ON SOYBEAN PLANTS AND SEEDS

Ignatyeva I.M., Prikhodko S.I., Domoratskaya D.A.

All-Russian Plant Quarantine Center, Bykovo, Russia (FGBU VNIICR)

Abstract. Along with timely detection, study of the features and correct diagnosis of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, it is extremely important to determine their prevalence and accounting for the damage they cause to the crop, as well as to develop preventive measures to exclude spreading this phytopathogen. To achieve these goals, new plant extract preparation techniques and diagnostic protocol were tested using officially permitted extraction kits Proba-GS (AgroDiagnostika), PhytoSorb-Avtomat-48 and PhytoSorb (Synthol). New diagnostic protocol was tested using *C. fl. pv. flaccumfaciens* strains and used with 225 samples collected during field inspection to know the ways of distribution of this pathogen in nature and in crop rotation. Data collected shows the absence of phytopathogen on analyzed areas and will be used in further assessments the applicability of the methods.

Keywords: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, identification, validation, field

Introduction. Many countries do not consider the causal agent of bacterial wilt on soybeans of quarantine significance. In the EPPO region *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* is listed as A2 quarantine pest [1]. According to modern data, it has restricted distribution in Russia [2].

In 2022, the harvested area of soybeans was estimated at 2627 thousand hectares, up 11,3% from last year. Due to increase of soybean exports from the Russian Federation it was necessary to perform quality diagnostics of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. The specialists from the FGBU “VNIICR” developed a diagnostic protocol that will enable to detect and identify *C. fl. pv. flaccumfaciens*.

Materials and methods. Plant extract preparation techniques were developed using vegetative parts and seeds of soybeans, kidney beans, mung beans and common beans [3, 4]. The following DNA extraction kits: containing prepared samples were tested: Proba-GS (AgroDiagnostika), PhytoSorb-Avtomat-48 and PhytoSorb (Synthol). These DNA extrac-

tion kits were examined with the PCR assays according to Tegli et al. (2002) [5] and Guimaraes et al. (2001) [6].

Results and discussion. The validation of PCR tests based on Tegli et al. (2002) and Guimaraes et al. (2001) demonstrated higher sensitivity when using reagent kit Proba-GS. However, the analytical sensitivity was assessed as 103 CFU/mL for both tests, reproducibility and repeatability — 100%, selectivity is not available. 60 strains of phytopathogenic and saprophytic bacteria were used to determine the analytical specificity.

The designed diagnostic protocol was tested during inspection procedures conducted in Russian in 2023. As a result, more than 225 samples collected from vegetative parts of soybean plants originating from major legume crops production areas were checked. According to obtained data *C. fl. pv. flaccumfaciens* was absent in the inspected soybean production areas.

Conclusion. In order to extend the Russian Federation possibilities as a soybean exporter new field investigations are needed to approve the absence of *C. fl. pv. flaccumfaciens* in the yield grown. The optimized diagnostic protocol for detection and identification can be recommended after full phytopathogen examination in field.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the Test Laboratory Center of the All-Russian Plant Quarantine Center staff for assistance in conducting research.

References:

[1] EPPO Bulletin PM 7/102. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. 2011. № 41. P. 320-328.

[2] Pilik RI, Tesic S, Ignatov AN, Tarakanov RI, Dorofeeva LV, Lukianova AA, Evseev PV, Dzhaliilov FS, Miroshnikov KA. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* causing bacterial wilt and blight on sunflower in Russia. *Plant Disease*. 2023. Vol. 107. № 5. P. 1621. DOI 10.1094/PDIS-05-22-1203-PDN.

[3] Ignatyeva, IM., Karimova EV, Prikhodko SI. Diagnostics of the bacterial blight pathogen of bean *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* in plant and seed material of grain leg-

umes using molecular genetics methods. Modern Synthetic Methodologies for Creating Drugs and Functional Materials (MOSM2020): Proceedings of The IV International Conference. Yekaterinburg, Russia, 2021. P. 030014. URL: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/5.0068504> (date: 26.02.2023). DOI 10.1063/5.0068504.

[4] Ignatyeva I, Prikhodko S, Bondarenko G, Bakaeva A. Scientific Monitoring of Leguminous Crops Cultivated Areas in the Russian Federation. Global Food Forum — 2021. Dialogue without Borders. Conference Proceedings: Global Food Forum 2021. EurAsian Scientific Editions SA, Geneva, Switzerland / EurAsian

Scientific Editions Ltd, Hong Kong / EurAsian Scientific Editions OÜ, Tallinn, Estonia, 2022. P. 120-124. DOI 10.56948/gebt7753.

[5] Tegli S, Sereni A, Surico G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. Letters in Applied Microbiology. 2002. Vol. 35. № 4. P. 331-337. DOI 10.1046/j.1472-765X.2002.01187.x.

[6] Guimaraés PM, Palmano S, Smith JJ, Grossi De Sá MF, Saddler GS. Development of a PCR test for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Antonie van Leeuwenhoek. 2001. Vol. 80. № 1. P. 1-10. DOI 10.1023/A:1012077425747.

THE PCR TEST OPTIMIZATION AS AN ADDITIONAL METHOD OF IDENTIFYING THE BACTERIAL BLIGHT OF PEA PATHOGEN

Ignatieva I.M., Bakaeva A.S., Prikhodko S.I.

All-Russian Plant Quarantine Center, Bykovo, Russia (FSBI VNIIKR)

Abstract. The of bacterial blight of pea causative agent *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett) Young et al. is the main sown pea phytopathogen. Due to the increase in the legumes production throughout the world, including Russia, high-quality and reliable methods of identifying this bacteriosis are needed. The Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance of the Russian Federation (Rosselkhoz nadzor) required to develop methodological recommendations for the detection and identification of the bacterial blight of pea causative agent. This paper presents a step of the study carried out with respect to optimize the polymerase chain reaction (hereinafter PCR) method for detecting a bacterial blight of pea agent using the primers PS11/PS14 based on the 16S-23S gene site, as well as to determine the analytical sensitivity index of the method. During the PCR test optimization carried out at the Test Laboratory Center of the All-Russian Plant Quarantine Center (FSBI VNIIKR), the amplification program and composition were selected and an analytical sensitivity index (102 CFU/ml) was determined, allowing to recommend a PCR test as one of the official tests for detecting the phytopathogen, both in seed and in plant material.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, quarantine phytosanitary management, diagnosis, PCR, optimization.

Introduction. The bacterial blight of pea causative agent *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett) Young et al. (hereinafter *P. syringae* pv. *pisi*) is a malicious phytopathogen of sown peas. Bacteriosis preserves both on the surface and inside the seeds without losing its viability for a long time. The disease severity requires seeds inspection and examination as well as survey activities on pea crops to prevent the pathogen spread, especially from countries with bacteriosis. The species is included in the quarantine list in a number of the Russian Federation trading partner countries [1]. Due to the lack of a regulatory document on the identification of phytopathogen in the Russian Federation, state export availability is limited [2]. Until recently, seeds from past crops and preventive treatment of sowing material were used contrary

to the classical microbiological methods with subsequent confirmation by molecular genetic methods in the world [3]. In 2021, developing methodological recommendations for the detection and identification of *P. syringae* pv. *pisi* became of great importance. The experiments to be conducted determined the conditions and timings for the pathogenicity test, the phytopathogen isolation on nutrient media. A comparative evaluation of the detection sensitivity showed a soaking method and a crushing method are equally effective. As molecular diagnostic methods, the DNA extraction method using the Sample-GS kit of AgroDiagnostics LLC and the PCR method according to Qing Ch et al. [4], [5] were recommended. The aim of the present study is to develop an additional molecular PCR method to detect the bacterial blight of pea pathogen including a PCR method optimization to detect the bacterial blight of pea pathogen using the PS11/PS14 primers based on the 16S-23S gene site [3]; and an analytical sensitivity index evaluation of the method (hereinafter referred to as AS).

Materials and methods. A reference bacterium strain CFBP 2105 (the French Collection of Phytopathogenes Bacteria (CFBP), Paris, France) *P. syringae* pv. *pisi* was used as a target organism in the study.

A promising method for detecting phytopathogen from vegetative parts of plants and seed material is the molecular diagnostic method based on PCR, which allows to quickly and reliably detect bacterial blight of pea. The PCR method will detect a 685 bp amplification product specific for *P. syringae* pv. *pisi*, based on 16S-23S gene site-based primers (PS11 direct primer 5'-GGTTAC CACGGTGTGATT-3' and PS14 reverse primer 5'-CTTTCATCGCCTCTGACT-3') [3].

Results and discussion. For the correct use of the diagnostic set, the classical PCR test optimization is needed. The amplification program and conditions for detecting the bacterial blight of pea pathogen using the PS11/PS14 primers based on the 16S-23S gene site were synchronized with the amplification program and conditions according to Qing et al. The mixture of reagents for performing a single reaction with

a volume of 25 µl contained as follows: 5 µl — 5×Reaction mixture for PCR, 0.6 µl — PS11, 0.6 µl — PS14, 2 µl — DNA, 16.8 µl — water. Tests were carried out in a T 100 Thermal Cycler Bio-RAD amplifier (Bio-RAD, USA) with the following program: primary denaturation at 94 °C for 5 min; then 35 cycles (94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s) and 72 °C for 5 min.

A standard base suspension with a concentration of 108 CFU/ml was prepared to determine the AS value (the pathogen culture loop was suspended in 1000 µl of 0.01 M sterile phosphate-saline buffer PBS). Then, a series of 8 ten-fold dilutions were prepared with step-by-step transferring 100 µl of the previous dilution to 900 µl of the subsequent PBS. Next, 100 µl of suspension was placed on Petri plates on the SNAC culture medium to count CFU value [3]. To prepare pea extracts with different contamination levels, 900 µl of plant extract was transferred to the new tubes and 100 µl of bacterial suspension, resulting in concentration sequence from 108 CFU/ml down to 100 CFU/ml. In total, eight 10-fold dilutions were prepared in three-fold repetition. Pea extract free of bacteriosis agent was used as a negative control. Then, 200 µl were taken from each sample to isolate DNA with the recommended commercial kit «Sample-GS» (AgroDiagnostics LLC). After conducting the classical PCR and counting CFU, the analytical sensitivity indicator of the method was determined. As a result, the PCR test was optimized to detect the bacterial blight of pea with primers PS11/PS14 based on the 16S-23S gene site in comparison with the primary system according to Qing et al. amplification program and composition. The analytical sensitivity index of the PCR test was evaluated. As found, using the extracting bacteria commercial kit «Sample-GS» gives the ability to detect the pathogen as low as 10² CFU/ml.

Conclusion. Further studies are needed to determine the PCR analytical specificity score according to the PS11/PS14 primers. After full testing to have been done, the proposed PCR method can be recommended as one of the official tests to detect *P. syringae* pv. *pisi* bacterial blight of pea in both plant and seed material.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the FSBI VNIKR staff for assistance in conducting research.

References:

- [1] Игнатъева ИМ, Словарева ОЮ, Башкирова ИГ. Применение теста на патогенность в диагностике возбудителя бактериального ожога гороха. Журнал «Фитосанитария. Карантин растений», Сентябрь 2021. 3 (7):40-46.
- [2] АБ Центр. Экспорт гороха из России в 2001-2019 гг. [Электронный ресурс] — URL: <https://ab-centre.ru/news/eksport-goroha-iz-rossii-v-2001-2019-gg> (дата: 2021-03-15).
- [3] Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* on Pea Seed. ISHI-Veg Int. Tech. Group. 2020.
- [4] Qing Ch, Jun-ting Q, Zhen-ji L, Zhi-peng F, Fu-rong L, Hong-yun C, Jian-ping Y. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from imported Canadian pea seeds. Acta Phytopathologica Sinica. 2016. 46(2):169-175.
- [5] Игнатъева ИМ, Словарева ОЮ. Применение метода ПЦР для идентификации возбудителя бактериального ожога гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* в семенном и растительном материале зернобобовых культур. Сборник материалов 11-й Всероссийской конференции молодых учёных и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур» 25–26 февраля 2021 г., г. Краснодар. с. 182–186. DOI 10.25230/conf11-2021-182-186.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРОГА МЕЖДУ ВНУТРИВИДОВОЙ И МЕЖВИДОВОЙ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЧИВОСТЯМИ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ФИТОСАНИТАРНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАСЕКОМЫХ И КЛЕЩЕЙ МЕТОДОМ ДНК-БАРКОДИНГА

Камаев И.О., Шипулин А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений», Московская область, Россия

Введение. ДНК-баркодинг — один из основных методов диагностики карантинных видов насекомых и клещей, который применяется фитосанитарии (диагностический протокол ЕОКЗР РМ 7/129(2), Методические рекомендации 158-2019 МР ВНИИКР). Молекулярным маркером зачастую служит «фолмеровский фрагмент» гена цитохром-с-оксидазы I субъединицы (COI). При этом применимость этого участка генома в качестве молекулярного маркера для разных групп насекомых и клещей как для филогенетических исследований, так и для фитосанитарной диагностики обсуждается. Определенные ограничения накладывает то, что внутривидовая изменчивость маркера не определена, также как и не оценены межвидовые генетические различия (межвидовой порог

на уровне рода. Последнее фактически затрудняет применение ДНК-баркодинга для диагностики в практике фитосанитарных лабораторий.

Цель работы — определение порога между внутривидовой и межвидовой генетическими изменчивостями маркеров трех модельных карантинных объектов Единого перечня Евразийского экономического союза (Решение Совета ЕЭК от 30.11.2016 г. №158 в действ. ред.): красный томатный паутинный клещ *Tetranychus evansi* (Acari: Trombidiformes: Tetranychidae), калифорнийская щитовка *Diaspidiotus perniciosus* (Insecta: Hemiptera: Diaspididae), натальская плодовая муха *Ceratitits rosa* (Insecta: Diptera: Tephritidae), для обеспечения фитосанитарной диагностики методом ДНК-баркодинга.

Материалы и методы. Исследованы оригинальные и депонированные в Генбанке нуклеотидные последовательности фрагментов митохондриального и ядерного генома для каждого карантинного объекта и близких к нему видов (в каждом конкретном случае набор участков различался). Выделение ДНК базировалось на протоколе набора «ДНК-Экстран-2» (Москва, «Синтол»). Были исследованы фрагменты. Постановку ПЦР в каждом конкретном случае проводили с определенным набором праймеров и условий.

Значения генетических дистанций (GD) рассчитаны в программе MEGA7 с помощью двухпараметрической модели Кимуры (K2P). Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали метод обнаружения межвидового порога («barcoding gap») между внутри- и межвидовыми генетическими дистанциями, реализованный в программе ABGD (Puillandre et al., 2012).

Результаты. Красный томатный паутинный клещ *Tetranychus evansi* Baker&Pritchard 1960 по фрагменту COI хорошо дифференцируется от большинства широко распространенных и инвазивных видов рода *Tetranychus*, включая представителей группы *desertorum*, к которому относится. Среднее значение генетических дистанций равно 13.7%. Значение генетических дистанций у особей *T. evansi* по указанному маркеру варьирует от 0 до 3.6%, в среднем составляя 1.12. По результатам анализа установлено, что генетические дистанции *T. evansi* и исследуемых видов рода *Tetranychus* не перекрываются, то есть наблюдается явный «barcoding gap», равный 5.0%. При этом для клещей группы *urticae*, к которой относятся большинство видов — вредителей с/х культур России, данный фрагмент не может быть использован в диагностических целях и требуется поиск подходящего маркера.

Калифорнийская щитовка *Diaspidiotus perniciosus* (Comstock 1881): анализировали фрагменты ядерного (Ef1 α , 28s) и митохондриального генома (COI, COII). Было установлено, что фрагменты ядерного генома не могут быть использованы в качестве маркеров для диагностики щитовок из-за сходства нуклеотидного состава и отсутствия межвидового порога. Нуклеотидные последовательности по участкам митохондриального генома для исследуемых видов щитовок характеризуются высокой степенью вариабельности: значения генетических дистанций между *C. perniciosus* и видами рода *Diaspidiotus* варьировали в пределах 11.0-19.0 % COI и 8.0-17.0 % COII. Кроме этого, методом ABGD отмечен межвидовой порог «barcoding gap», значение которого составило 7.0 % COI и 4.0-5.0 % COII.

Натальская плодовая муха *Ceratitis rosa* Karsch 1887: проведен анализ нуклеотидных последовательностей 6 фрагментов митохондриального генома — COI, COII, COIII, Cytb, ND2 и ND3. По результатам анализа установлено, что только для одного участка (COIII) был выявлен межвидовой порог и потенциально может быть использован для диагностики натальской плодовой мухи методом ДНК-баркодинга. Дальнейшее развитие метода в отношении плодовых мух рода *Ceratitis* может быть осуществлено на основе фрагментов ядерного генома.

Заключение. Таким образом, для обеспечения фитосанитарной диагностики насекомых и клещей методом ДНК-баркодинга целесообразно определять подходящий молекулярный маркер для конкретной группы организмов и значение межвидового порога («barcoding gap»).

Работа частично выполнена в рамках НИОКТР № 123030100019-6.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХЛОРОПЛАСТНЫХ МАРКЕРОВ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PICEA* В КРИМИНАЛИСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

Верчук А.Н.^{1,2}

¹ Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Введение. Республика Беларусь обладает значительным лесным фондом, который имеет промышленный потенциал, используемый в различных отраслях экономики. Стабильное развитие секторов экономики, связанных с лесным хозяйством, возможно только при рациональном использовании природных ресурсов. По данным лесного фонда Министерства лесного хозяйства, наиболее распространены хвойные леса, которые занимают почти 60% от площади лесного массива, а непосредственно ель занимает 10%.

Расследование правонарушений, связанных с незаконными рубками, а также уголовных преступлений

может столкнуться с вещественными доказательствами растительного происхождения, которые будут переданы на исследование судебных экспертам. Одной из основных задач судебного эксперта является идентификация растений по их фрагментам, что возможно лишь при корректном установлении видового происхождения.

Цель работы — анализ с использованием методов биоинформатики хлоропластных маркеров ДНК-штрихкодирования для оценки эффективности дифференциации наиболее распространенных в Республике Беларусь представителей рода *Picea* в криминалистических целях.

Материалы и методы. На территории Республики Беларусь род *Picea* представлен тремя аборигенными видами: *Picea abies*, *Picea pungens*, *Picea obovate*, — и еще два вида *Picea glauca*, *Picea omorika* часто используются для озеленения городских территорий. Оценка эффективности ДНК-штрихкодов для дифференциации этих видов была проведена с помощью биоинформатического анализа наиболее часто используемых хлоропластных маркеров (*PsbA-trnH*, *MatK*, *rbcl*) штрихкодирования. По исследуемым маркерам было проанализировано 243 нуклеотидных последовательности, которые были загружены из базы данных Национального центра биотехнологической информации (англ. National Center for Biotechnology Information, NSBI). Локальное выравнивание осуществлялось с помощью функции Clustal W программы BioEdit. Статистический анализ был проведен программой MEGA X v.10.2.4, используя двухпараметрическую модель Кимуры (англ. Kimura 2-parameter, K2P) с построением политомической филограммы, используя дискретный метод наибольшего правдоподобия (Test Maximum likelihood method). Количество анализируемых последовательностей

ДНК-штрихкодов по исследуемым маркерам и результаты их статистического анализа представлены в таблице.

Результаты и обсуждение. Анализируя полученные результаты, которые представлены в таблице, можно сделать выводы, что наименьшее отличие внутривидовой от межвидовой дистанции наблюдалось для маркера *PsbA-trnH*, другие исследуемые маркеры имели более значительную разницу в значениях.

По количеству выявленных гаплотипов наиболее высокий результат был определен для маркера *MatK*, для которого было установлено 18 различных гаплотипов, 17 из которых были видодифференцирующими. Данный маркер продемонстрировал свою высокую эффективность для установления видовой принадлежности образцов, происходящих от видов *Picea pungens*, *Picea glauca*, *Picea omorika*. По маркеру *MatK* виды *Picea abies* и *Picea obovate* имели общий гаплотип, что значительно снизило эффективность данного ДНК-штрихкода. Однако, как для *Picea abies*, так и для *Picea obovate*, были обнаружены уникальные для данных видов нуклеотидные замены, при обнаружении которых возможно точно дифференцировать исследуемый объект.

Исследуемый маркер	<i>PsbA-trnH</i>	<i>MatK</i>	<i>rbcl</i>
Количество исследуемых штрихкодов	54	83	106
Количество анализируемых видов	5	5	5
Длина маркера (п.н.)	≈600	≈1700	≈1450
Среднее значение внутривидовой дистанции	0,00116	0,00042	0,00016
Среднее значение межвидовой дистанции	0,00499	0,00223	0,00301
Количество гаплотипов	9	18	10
Видодифференцирующие гаплотипы	8	17	8
Кол-во видов, дифференцирующихся со 100% вероятностью	3	3	2
Однозначная идентификация (%)	40,74	69,88	39,62
Неоднозначная идентификация (%)	59,26	30,12	60,38

Маркеры ДНК-штрихкодирования *PsbA-trnH* и *rbcl* продемонстрировали более низкую эффективность к дифференциации представителей рода *Picea* относительно маркера *MatK*, которая составила 40,74% и 39,62% соответственно. Для маркера *PsbA-trnH* было обнаружено 9 гаплотипов, 8 из которых являлись уникальными только для одного вида. Как и в случае маркера *MatK*, для *PsbA-trnH* общая нуклеотидная последовательность была обнаружена для пары видов *Picea abies* и *Picea obovate*, что усложняет установление вида. Для *Picea abies* было обнаружено еще два уникальных, редко встречаемых гаплотипа, при обнаружении которых возможно установить вид.

При анализе нуклеотидных последовательностей рода *Picea* по маркеру ДНК-штрихкодирования *rbcl* было установлено 10 гаплотипов, 8 из которых являлись видодифференцирующими. Для видов *Picea abies* и *Picea obovate* было установлено по одному уникальному гаплотипу, а также один общий, частота встречаемости

которого значительно выше, что заметно снижает эффективность данного маркера. На способности к дифференциации данного маркера негативно сказалось наличие одной нуклеотидной последовательности *Picea abies*, которая была идентична для большинства *Picea pungens*.

Выводы. Проанализировав 243 нуклеотидных последовательности, был установлен относительно высокий дифференцирующий потенциал хлоропластных маркеров *psbA-trnH*, *matK*, *rbcl* для установления видовой принадлежности наиболее распространенных в Республике Беларусь представителей рода *Picea*. С помощью хлоропластных маркеров ДНК-штрихкодирования *PsbA-trnH*, *MatK*, *rbcl* была точно установлена видовая принадлежность 40,74%, 69,88%, 39,62% образцов соответственно.

Наиболее сложным вопросом для дифференциации видов оказалось разделение *Picea abies* и *Picea obovate*, поскольку ни один из исследуемых маркеров не смог устано-

вить точно видовое происхождение объектов, из-за наличия общих нуклеотидных последовательностей.

Видовая идентификация *Picea pungens*, *Picea glauca*, *omorika* успешно проводилась с помощью маркеров *PsbA-trnH* и *MatK*, однако использование более короткого марке-

ра более приемлемо в судебной генетической экспертизе из-за специфики поступающих на исследование объектов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант № Б22М-068 от 04.05.2022.

ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВОГО ЧУЖЕРОДНОГО ВИДА МИНИРУЮЩЕЙ МОЛИ *CHRYSASTER OSTENSACKENELLA* (LEPIDOPTERA: GRACILLARIIDAE) НА РОБИНИИ ЛОЖНОАКАЦИЕВОЙ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Кириченко Н.И.^{1,2}, Коляда Н.А.³, Гомбоц С.⁴

¹ Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия

² Сибирский федеральный университет (СФУ), Красноярск, Россия

³ ФНИЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

⁴ Крань, Словения

Введение. Насекомые, минирующие листья растений, в особенности представители семейства молей-пестрянок (Gracillariidae), относятся к числу наиболее распространенных вредителей декоративных древесных растений [Масляков, Ижевский, 2011; Kirichenko et al., 2019]. В последние десятилетия некоторые листовые минеры расширили свои первичные ареалы и стали наносить заметный ущерб растениям на новых территориях [Kirichenko et al., 2019]. Отдельные виды продвинулись след за своими растениями-хозяевами, интродуцированными в новые регионы. Несколько десятилетий назад два вида североамериканских минирующих молей *Parectopa robiniella* Clemens, 1863 и *Macrosaccus robiniella* (Clemens, 1859) проникли на европейский континент и распространились в европейскую часть России, куда в свое время было завезено североамериканское растение — робиния ложноакациевая *Robinia pseudoacacia* L. (Fabaceae) [Medzihorský et al., 2023]. Это растение было также завезено на Дальний Восток России, в Приморский край, и сегодня кроме арборетума Горнотаежной станции (ГТС) ДВО РАН (с. Горнотаежное, Уссурийск) оно встречается в ряде населенных пунктов юга края. Сведения о распространении североамериканских робиниевых минирующих молей в Приморском крае до недавнего времени отсутствовали. Целью работы являлось обследование деревьев *R. pseudoacacia* для выявления характерных повреждений чужеродных молей в Приморском крае.

Материалы и методы. Исследования проводились в июле-августе 2022 г. в дендрарии ГТС и окрестностях сел Горнотаежное и Хороль (расстояние между последними ~ 71 км по прямой). В каждом пункте на 5-10 деревьях со всех сторон света осматривали нижние ветви на наличие на листьях характерных повреждений минирующих молей (пятновидных мин). Собранные образцы (20 листьев с минами, содержащими взрослых гусениц) транспортировали в лабораторию ГТС. Листья с минами помещали в пластиковые пакеты с замком зип-лок для выведения имаго. Отродившихся бабочек (7 шт.) замаривали, размещали на энтомологическом матрасике и вместе с гербаризиро-

ванными листьями с минами доставляли в лабораторию лесной зоологии ИЛ СО РАН (Красноярск) для идентификации и отбора проб для ДНК-баркодирования. Здесь бабочек накалывали на минуции, исследовали их внешнюю морфологию, мины и изготавливали генитальные препараты самцов. У двух бабочек отделяли задние ноги для ДНК-баркодирования, которое осуществлялось в Канадском центре ДНК-баркодирования (CCDB, Canadian Centre for DNA barcoding) при Гуэлфском университете (Канада). Секвенирование участка гена субъединицы I митохондриальной цитохром с-оксидазы (COI) (658 п.н.) проводилось по методу Сэнгера. Видовую принадлежность образцов по их ДНК-баркодам осуществляли на платформе BOLD (Barcode Of Life Data system) [Ratnasingham, Hebert, 2007].

Результаты. К нашему удивлению в сборах с российского Дальнего Востока не было обнаружено ни одного экземпляра чужеродных робиниевых молей *P. robiniella* и *M. robiniella*, которые сегодня достаточно широко встречаются в странах Европы и европейской части России на робинии ложноакациевой. По внешней морфологии (рисунку переднего крыла) и генитальным структурам самцов исследованные бабочки из Приморского края были идентифицированы как другой североамериканский вид — *Chrysaster ostensackenella* (Fitch, 1859) (Gracillariidae). Молекулярно-генетические исследования также подтвердили видовую принадлежность образцов из Приморья с соответствием уникальному коду *Ch. ostensackenella* (BOLD:AAH2442) в BOLD.

Этот североамериканский вид моли был недавно выявлен в Китае (2015 г.) [Bai et al., 2015; Liu et al., 2015], Южной Кореи (2017 г.) [Koo et al., 2019], Японии (2021 г.) [Sawada, Sakurai, 2022] и Европе — пока только в Италии (2022 г.) [Huemer, Mayr, 2022]. Здесь мы сообщаем о первом обнаружении *Ch. ostensackenella* на территории России по находкам в Приморском крае, приводим данные по биологии вида и анализируем ДНК-баркоды моли из ее первичного (Северная Америка) и вторичного ареала (российский Дальний Восток, страны Восточной Азии, Италия), а также указываем характеристики мин нового чужеродного вида,

позволяющие отличить его повреждения от таковых *P. robiniella* и *M. robiniella* [Kirichenko et al., 2023].

Выводы. Мы не исключаем дальнейшее распространение *Ch. ostensackenella* в Европе (в том числе проникновение в европейскую часть России) и на Дальнем Востоке, учитывая наличие в данных регионах кормовой базы.

Полевые сборы в Приморском крае (Россия) проводились в рамках государственного задания ФНЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН (шифр научной темы 0207-2021-0003, № 121031000120-9), исследование морфологии бабочек — в рамках базового проекта Института им. В.Н. Сукачева СО РАН (№ FWES-2021-0011), ДНК-баркодирование выполнено при поддержке гранта РФФИ (№ 22-16-00075).

Список литературы:

Масляков В.Ю., Ижевский С.С. Инвазии растительноядных насекомых в европейскую часть России. М.: ИГРАН, 2011. 272 с.

Bai H.Y., Xu J.S., Dai X.H. Three new species, two newly recorded species and one newly recorded genus of Lithocolletinae (Lepidoptera: Gracillariidae) from China // Zootaxa. 2015. Vol. 4032. P. 229–235.

Huemer P., Mayr T. *Chrysaster ostensackenella* (Fitch, 1859), a potentially invasive species newly recorded from Europe (Lepidoptera, Gracillariidae) // Check List. 2022. Vol. 18. P. 1237–1242.

Kirichenko N., Augustin S., Kenis M. Invasive leafminers on woody plants: a global review of pathways, impact, and management // J. Pest Science. 2019. Vol. 92. P. 93–106.

Kirichenko N.I., Kolyada N.A., Gomboc S. First Discovery of the North American leaf-mining moth *Chrysaster ostensackenella* (Lepidoptera: Gracillariidae) in Russia: the genetic diversity of a novel pest in invaded vs. native range // Insects. 2023. Vol. 14(7):642.

Koo J.M., Kim S.K., Cho S.W. *Chrysaster ostensackenella* (Fitch, 1859) (Lepidoptera: Gracillariidae) New to Korea // Korean J. Applied Entomology. 2019. Vol. 58. P. 225–228.

Liu T., Cai Y.-P., Wang C.-Z., Li H.-H. Biology of *Chrysaster ostensackenella* (Fitch), a new invasive pest of black locust *Robinia pseudoacacia* L. plantations, and a new record of a related species, in China // Chinese Journal of Applied Entomology. 2015. Vol. 52. P. 942–950.

Medzihorský V., Trombik J., Mally R., Turčáni M., Liebhold A.M. Insect invasions track a tree invasion: global distribution of black locust herbivores // J. Biogeography. 2023. Vol. 50. P. 1285–1298.

Ratnasingham S., Hebert P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>) // Molecular Ecology Notes. 2007. Vol. 7. P. 355–364.

Sawada M., Sakurai M. The first record of an alien species, *Chrysaster ostensackenella* (Fitch, 1859) (Lepidoptera: Gracillariidae), in Japan // Jpn. J. Ent. 2022. Vol. 25. P. 106–110.

Раздел 25. НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ У БЕРЕМЕННЫХ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Боровкова Л.В., Колобова С.О., Андосова Л.Д., Шахова К.А., Тихомирова Ю.Р., Дмитриева А.А.

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России Нижний Новгород

Актуальность. В современном обществе гипертоническая болезнь (ГБ) у беременных остается одной из междисциплинарных актуальных вопросов клинической медицины, поскольку увеличивает риск развития больших акушерских синдромов: преэклампсии (ПЭ) и задержки роста плода (ЗРП), а также материнской и младенческой заболеваемости/смертности. Патогенез осложнений беременности во многом связан с генерализованным нарушением регуляции сосудистого тонуса, эндотелиальной дисфункцией, нарушением плацентации. Однако ранние прогностические критерии больших акушерских синдромов по-прежнему основаны на неспецифических клинических и лабораторных признаках. Перспективным является изучение клинического значения эндотелина-1 и сосудистой молекулы адгезии в I триместре у беременных, страдающих ГБ.

Цель. Дать оценку содержания эндотелиальных маркеров эндотелина-1 и sVCAM-1 в I триместре беременности у беременных женщин с ГБ в зависимости от последующего развития больших акушерских синдромов.

Материалы и методы. Критериями включения в исследование служили пациентки в возрасте 18-45 лет в сроке беременности 10-13 недель. Основная группа — 54 женщины с хронической артериальной гипертензией (гипертонической болезнью I стадии), контрольная группа — 30 здоровых беременных женщин. Уровни исследуемых маркеров определяли в образцах сыворотки крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты. По результатам исследования было выявлено, что у пациенток с ГБ в I триместре беременности выявлялись статистически значимо более высокие уровни эндотелина-1 и sVCAM-1 по сравнению со здоровыми пациентками ($p=0,003$ в обоих случаях). Анализ течения беременности у испытуемых показал достоверные различия в развитии плацентарной недостаточности во II-III триместре гестации: в основной группе — 59,9% случаев, в контрольной — 6,7% соответственно ($P=0,002$). Было установлено, что в основной группе тяжелая ПЭ с развитием ЗРП, плацентарных расстройств, нарушением маточно-плацентарного и плодового кровотока развиваются достоверно чаще, чем в контрольной и составляет 16,6% и 3,3% случаев соответственно ($P=0,006$ во всех случаях). У женщин с ГБ, беременность которых в последствии осложнилась развитием плацентарной недостаточности ($n=32$), а также у пациенток с тяжелой ПЭ и ЗРП ($n=9$), в I триместре имеются статистически значимо

более высокие уровни ЭТ-1 по сравнению с пациентками, имеющими благоприятное течение гестации на фоне ГБ ($p=0,002$ и $p=0,003$ соответственно). При проведении анализа уровней sVCAM-1 в I триместре мы не получили достоверных различий между показателями у пациенток с осложненной беременностью на фоне ГБ и случаями с отсутствием нарушений ($p>0,05$ во всех случаях). В связи с этим маркер воспаления sVCAM-1 не целесообразно рассматривать для прогнозирования больших акушерских синдромов у женщин с ГБ.

Заключение. Установлена роль сосудистой молекулы адгезии в развитии субклинического воспаления в сосудистой стенке при ГБ у беременных и может выступать как маркер ГБ у беременных на ранних сроках гестации. Также при ГБ подтверждено нарушение функционального состояния эндотелия сосудов в I триместре беременности. У пациенток с ГБ достоверно чаще беременность осложняется преэклампсией, задержкой развития плода и плацентарной недостаточностью по сравнению со здоровыми женщинами. В связи с этим эндотелин-1 целесообразно рассматривать для прогнозирования больших акушерских синдромов у женщин с ГБ, однако требуется дальнейшее изучение значимости данного показателя на большей выборке пациенток, а также в комбинации с другими биохимическими и биофизическими маркерами.

Литература:

1. Shikh EV, Zhukova OV, Ostroumova OD, Sharonova SS. To the question of pharmacogenetic approaches in the treatment of arterial hypertension in pregnant women. *Obstetrics and Gynecology*. 2020; 2: 22-28. Russian (Ших Е.В., Жукова О.В., Остроумова О.Д., Шаронова С.С. К вопросу о фармакогенетических подходах в лечении артериальной гипертензии у беременных //Акушерство и гинекология. 2020. № 2. С. 22-28.) DOI: 10.18565/aig.2020.2.22-28

2. Omboni S, Posokhov IN, Parati G, Avolio A, Rogoza AN, Kotovskaya YV, et al. Vascular Health Assessment of The Hypertensive Patients (VASOTENS) Registry: Study Protocol of an International, Web-Based Telemonitoring Registry for Ambulatory Blood Pressure and Arterial Stiffness. *JMIR Res Protoc*. 2016; 5(2): e137. DOI: 10.2196/resprot.5619

3. Rokotyanskaya EA, Panova IA, Malysheva AI, Fetisova IN, Fetisov NS, Kharlamova NV, Kuligina MV. Technologies for Prediction of Preeclampsia. *Modern Technologies in Medicine*. 2020; 12(5): 78. Russian (Рокотьянская Е.А., Панова И.А., Малышкина А.И., Фетисова И.Н., Фетисов Н.С., Харламова Н.В., Кулигина М.В. Технологии прогнозирования

преэклампсии //Современные технологии в медицине. 2020. Т. 12, № 5. С. 78-86.) doi.org/10.17691/stm2020.12.5.09

4. Sidorova IS, Nikitina NA, Filippov OS, Guseva EV, Ageev MB, Kokin AA. Resolved and unresolved issues of preeclampsia based on the results of the analysis of maternal mortality over the past 10 years. *Obstetrics and Gynecology*. 2021; 4: 64-74. Russian (Сидорова И.С., Никитина Н.А, Филиппов О.С., Гусева Е.В., Агеев М.Б., Кокин А.А. Решенные

и нерешенные вопросы преэклампсии по результатам анализа материнской смертности за последние 10 лет // Акушерство и гинекология. 2021. № 4. С. 64-74.) DOI: 10.18565/aig.2021.4.64-74

5. Hollegaard B, Lykke JA, Boomsma J. Time from pre-eclampsia diagnosis to delivery affects future health prospects of children. *Evol Med Public Health*. 2017; 2017, 1: 53-66. DOI 10.1093/emph/eox004

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ РНК-СОДЕРЖАЩЕГО ВИРУСА *HENDRA* НА ОСНОВЕ ДЕЗОКСИРИБОЗИМОВ

А.Д. Кириченко¹, Е.А. Брюшкова², А.С. Долгова¹, В.Г. Дедков¹

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия

² МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия

Введение. Вирус *Hendra* (семейство Paramyxoviridae, род *Henipavirus*) представляет собой высокопатогенный РНК-содержащий вирус, естественным хозяином которого являются плодовые летучие мыши (род *Pteropus*). Этот вирус вызывает серьезные эпидемии заболеваний у людей и лошадей в Австралии, при этом смертность составляет 60% и 75% соответственно [1]. Современные методы диагностики вируса *Hendra* (*HeV*) включают полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и ее модификации, иммунофлюоресцентный анализ (ИФА), а также серологические методы. Эти методы требуют специализированного оборудования и лабораторий с соответствующим уровнем безопасности, что делает их трудоемкими. На данный момент существует только одна тест-система, основанная на методе петлевой изотермической амплификации (LAMP), которая может быть использована для диагностики вируса *Hendra* в условиях ограниченных технических и временных ресурсов [2]. Поэтому все еще существует потребность в разработке простых, быстрых и точных тест-систем для обнаружения вирусов в полевых условиях.

Основой для такой тест-системы могут стать дезоксирибозимы. Дезоксирибозимы — это короткие синтетические ДНК-олигонуклеотиды, которые обладают каталитической активностью. Они способны катализировать химическую реакцию расщепления фосфодиэфирной связи между нуклеотидами при наличии двухвалентных ионов металлов [3]. Дезоксирибозим 10-23 хорошо изучен, способен расщеплять связь между любыми парами пурин-пиримидин и работает при pH 7,4, используя катионы магния в качестве кофактора.

Цель и задачи. Целью данного исследования является разработка высокоспецифичной системы обнаружения РНК вируса *Hendra* на основе дезоксирибозима 10-23, названного *Dz_HeV*. Задачи исследования — определение целевого участка РНК, дизайн нуклеотидных последовательностей биосенсора и проверка его работоспособности.

Материалы и методы. Все последовательности *HeV*, доступные в GenBank (NCBI), были выровнены для иден-

тификации консервативных сайтов с помощью BioEdit. Целевой фрагмент был выбран с помощью PLOTCON. Вторичная структура РНК может препятствовать образованию комплекса РНК-биосенсор, чтобы предотвратить это, были предсказаны вторичные структуры в The Nucleic Acid Package (NUPACK). Для нацеливания дезоксирибозима требуется участок 16-22 нуклеотида, поэтому была выбрана более короткая целевая область с помощью BLAST с учетом вторичной структуры.

Для обнаружения целевой РНК мы синтезировали две последовательности (бинарные *Dz1* и *Dz2*), каждая из которых содержит комплементарную часть целевой РНК, половину каталитического ядра дезоксирибозима 10-23 и комплементарную часть флуоресцентного субстрата. Таким образом, при наличии целевой РНК в растворе происходит связывание РНК через Уотсон-Криковские взаимодействия, что приводит к сборке каталитического ядра. Затем это ядро расщепляет субстрат (*fsub*), который помечен флуорофором и гасителем, что приводит к высвобождению флуорофора в раствор.

Разработанный нами биосенсор *Dz_HeV* требует преинкубации в буфере для сборки (5 минут, 95 °С), после чего может храниться при -20 °С, при этом своих каталитических свойств он не теряет.

Для оценки диагностического потенциала биосенсора мы измеряли флуоресценцию FAM в растворе, содержащем синтетическую РНК длиной 35 нуклеотидов (H35), соответствующую целевой последовательности *HeV*, *fsub*, меченный парой FAM-BHQ1 и *Dz_HeV*. Инкубация длилась 20 минут при 37 °С и проводилась в приборе T16-ISO Instrument Axxin. Чувствительность *Dz_HeV* рассчитана в виде отношений F1/F0 серии образцов, где F0 означает сигнал флуоресценции от контрольных образцов, представляющих собой смесь *Dz_HeV* и *fsub*, а F1 означает сигнал флуоресценции от образцов, содержащих также смесь *Dz_HeV*, *fsub* и целевую синтетическую РНК H35 в разной концентрации. В случае если соотношение F1/F0 равно или больше 1.5, мы можем уверенно отделить положительные образцы от отрицательных.

Специфичность Dz_HeV оценивали в тех же условиях в присутствии синтетических РНК шести других РНК-вирусов аналогичной длины: Nipah, Machupo, Sabia, Junin, Guanarito и SARS-CoV.

Результаты. В ходе данного исследования в качестве целевого участка был выбран фрагмент гена N вируса *Hendra* длиной 35 нт. Была разработана модель высокоспецифичного биосенсора Dz_HeV для детекции РНК вируса *Hendra*. Предел обнаружения целевой РНК биосенсором Dz_HeV составляет 10 нМ, время развития сигнала 20 минут при температуре 37 °С. В ходе оценки специфичности Dz_HeV флуоресцентный сигнал был зафиксирован только при наличии в реакционной смеси Н35 в серии образцов.

Выводы. В процессе исследования для обнаружения вируса *Hendra* был разработан недорогой, высокоточный и быстрый биосенсор, основанный на использовании дезоксирибозима 10-23. В присутствии целевой РНК происходит сборка каталитического ядра дезоксирибозима, которое расщепляет меченую флуорофором и тушителем шпильку-субстрат, что приводит к высвобождению флуорофора в раствор. Для получения результата детекции требуется всего 20 минут, а инкубация проводится при 37 °С. Биосенсор требует предварительной сборки, но может храниться при -20 °С, что важно для создания тест-системы, включающей этапы

предварительной амплификации, детекции и передачи ее в использование.

В дальнейшем планируется оптимизировать биосенсоры для обнаружения вирусной РНК в клинических образцах. Поскольку биологические образцы могут содержать недостаточное количество копий вируса для обнаружения биосенсором, разрабатываемая тест-система будет включать следующие этапы: обратную транскрипцию, амплификацию, транскрипцию и детекцию. Это позволит увеличить чувствительность и надежность диагностики вируса *Hendra* в клинических образцах.

Работа выполнена в рамках государственной программы "Обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации".

Список использованной литературы.

1. Field, H., de Jong, C., Melville, D., Smith, C., Smith, I., Broos, A., Kung, Y. H., McLaughlin, A., & Zeddeman, A. (2011). *Hendra* virus infection dynamics in Australian fruit bats. *PLoS one*, 6(12), e28678.
2. Foord, A. J., Middleton, D., & Heine, H. G. (2012). *Hendra* virus detection using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of virological methods*, 181(1), 93–96.
3. Ma, L., & Liu, J. (2020). Catalytic Nucleic Acids: *Biochemistry, Chemical Biology, Biosensors, and Nanotechnology*. *iScience*, 23(1), 100815.

ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРИЧИН РАННЕЙ ЭМБРИОЛЕТАЛЬНОСТИ И НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Лебедев И.Н., Никитина Т.В.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

Актуальность. У человека около 15% клинически распознаваемых беременностей заканчивается невынашиванием беременности, при этом примерно половина случаев обусловлена хромосомными аномалиями эмбриона или плода, а причины гибели другой половины обычно остаются невыясненными. Поиск патогенетически значимых вариантов в геноме эмбрионов с нормальным кариотипом может пролить свет на вклад генетических факторов в эмбриональную летальность. Учитывая повышенную частоту пренатальной смертности в родословных женщин с невынашиванием беременности и тот факт, что у мышей нокаут примерно 30% генов приводит к внутриутробной летальности, можно предположить, что в геноме человека доля летальных вариантов также значительна. Варианты последовательности ДНК и варианты числа копий отдельных локусов, обуславливающие гибель эмбрионов с нормальным кариотипом, могут быть выявлены с помощью полноэкзомного/полногеномного секвенирования (WES/WGS) и хромосомного микроматричного анализа (ХМА), соответственно.

Основные результаты. Геномные исследования эмбриональной летальности сталкиваются со специфическими проблемами: 1) получение адекватных образцов (деградация геномной ДНК от образцов неразвивающихся

беременностей вследствие мацерации тканей приводит к уменьшению размеров фрагментов ДНК и неравномерности покрытия при секвенировании), вероятность контаминации эмбриональных образцов тканями матери; 2) ожидаемая высокая степень генетической гетерогенности при невынашивании беременности; 3) специфичный геномный ландшафт и отсутствие масштабных баз данных по геномам погибших эмбрионов заметно осложняет интерпретацию значимости обнаруженных вариантов, так как секвенирование экзона и, особенно, генома погибших эмбрионов выявляет огромные количества потенциально вредных вариантов.

Основная часть информации об экзонах и геномах при невынашивании беременности, полученная к настоящему времени, базируется на исследованиях единичных семей или небольших по численности несемейных выборок (либо абортусов, либо женщин с невынашиванием). Ранее внимание исследователей часто было направлено на гибель плодов с установленными при ультразвуковом исследовании пороками развития. Явление собственно невынашивания беременности, особенно в первом триместре, стало объектом исследования только в последние 5 лет. К настоящему времени опубликовано 37 исследований, в которых использовалось WES/WGS для выявления

ния вариантов при потерях беременности. Подавляющее большинство обнаруженных вариантов/генов не повторяется в различных исследованиях.

Показатель ADR (abnormality detection rate) определяет отношение количества случаев с вариантами диагностической ценности к количеству проанализированных случаев. Применение методов геномики для установления генетических причин пренатальной гибели в выборках плодов с аномалиями развития дает диагностические результаты в диапазоне от 14 до 57% [1-3]. Для выборок с невынашиванием беременности (как ПНБ, так и спорадических случаев) ADR варьирует от 13 до 100%, но эта цифра достаточно субъективна и зависит как от жесткости применяемых фильтров при выборе патогенетически значимых результатов, так и от исследуемой выборки (женщины, абортусы или трио). Например, при анализе случаев гибели плодов с аномалиями диагностический выход WES для трио был заметно выше, чем для образцов плода: 24% (11/45), по сравнению с 14% (4/29) в исследовании [1], 56% (19/34), по сравнению с 33% (9/27) в исследовании [4]. ADR также отличается для различных сроков беременности: так, в одном из исследований доля аномальных случаев в первом, втором и третьем триместрах составила 30%, 38% и 17% соответственно [5].

Что касается ХМА, то в диагностике причин невынашивания беременности в настоящее время он применяется в двух направлениях. Первое — это тест первой линии, второе — молекулярное кариотипирование спонтанных абортусов с предварительно цитогенетически установленным нормальным кариотипом. В первом случае, анализ 7 наиболее крупных исследований, проведенных к настоящему времени, с объемами исследуемых выборок более 1000 образцов [6-12] показывает, что хромосомные аномалии у спонтанных абортусов выявляются в среднем с частотой 53,5%, что сопоставимо с диагностической ценностью стандартного кариотипирования. В то же время, использование ХМА для спонтанных абортусов с нормальным кариотипом позволяет дополнительно обнаружить хромосомные аномалии от 10,0% [14] до 42,3% [15] (в среднем 19,4 %) эмбрионов, заметно улучшая диагностику причин невынашивания беременности. Использование для ХМА как минимум

двух разных тканей внезародышевого и эмбрионального происхождения — цитотрофобласта ворсин хориона и экстраэмбриональной мезодермы, увеличивает, по нашим собственным данным, диагностическую ценность и позволяет выявить числовые и микроструктурные хромосомные аномалии дополнительно у 35,1% эмбрионов, главным образом за счет межканевого хромосомного мозаицизма.

Выводы. Накопление информации по анализу геномной последовательности при эмбриональной гибели позволит идентифицировать гены, важные в раннем периоде онтогенеза человека, и определить варианты, нарушающие функции таких генов и приводящие к невынашиванию беременности. В настоящее время все имеющиеся базы данных, касающиеся гено-фенотипических корреляций у человека, ориентированы на патологию органов в постнатальном периоде. Это ставит задачу создания специальных баз данных генетических вариантов для случаев эмбриональной гибели, отражающих специфику данной патологии

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-65-00017, <https://rscf.ru/project/21-65-00017/>

1. Yates, C.L. et al. *Genet Med.* 19, 1171–1178 (2017).
2. Stals, K.L. et al. *Prenat. Diagn.* 38(1), 33–43 (2018).
3. Shamseldin, H.E. et al. *Genet. Med.* 20(4), 420–427 (2018).
4. Huang, W. et al. *BMC Med Genomics.* 16(1), 25 (2023).
5. Zhao, C. et al. *Genet Med.* 23(3), 435–442 (2021).
6. Levy, B. et al. *Obstet Gynecol.* 124, 202–209 (2014).
7. Zhou, Q. et al. *J Genet Genomics.* 43, 121— 131 (2016).
8. Chen, Y. et al. *Hum Mutat.* 38, 669–677 (2017).
9. Peng, J. P. and Yuan, H. M. *Yi Chuan.* 40, 779— 788 (2018).
10. Li, F. X. et al. *Mol Med Rep.* 22, 1269— 1276 (2020).
11. Wang, Y. et al. *J Mol Diagn.* 23, 38— 45 (2021).
12. Finley, J. et al. *Reprod Biomed Online.* 45, 125— 134 (2022).
13. Sahoo, T. et al. *Genet Med.* 19, 83–89 (2017).
14. Shimokawa, O. et al. *Am J Med Genet A.* 140, 1931–1935 (2006).
15. Rajcan-Separovic, E. et al. *Hum Reprod.* 25, 2913–2922 (2010).

CD68 КАК ИММУННЫЙ БИОМАРКЕР ГРАНУЛЕМАТОЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Лыкова К.О., Зубарева Т.С.

Санкт-Петербургский Научно-исследовательский Институт Фтизиопульмонологии МЗ РФ, (СПб НИИФ), Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Развитие гранулематозного воспаления тканей характерно для таких заболеваний, как туберкулез и саркоидоз, что делает их клинические, рентгенологические и морфологические картины схожими, а дифференцировку данных заболеваний — сложной, но необходимой задачей.

Хроническое воспаление при туберкулезной инфекции характеризуется формированием различных морфологических паттернов, таких как гранулема и туберкулема. Гранулема представляет собой узелок, скопление клеток

макрофагального типа. Туберкулема — это крупный очаг с наличием казеозного некроза, отграниченный клеточным валом, состоящим из макрофагов и лимфоцитов, а также фиброзным слоем, отделяющим некротический центр от нормальной ткани легкого.

Отличительной чертой саркоидоза является формирование неказеозных гранулем. Центральная зона гранулемы представлена эпителиоидными клетками, макрофагами и гигантскими многоядерными клетками, а периферия — лимфоцитами и фибробластами, склероз но-

сит кольцевидный характер. На сегодняшний день одной из основных гипотез возникновения саркоидоза является теория аутоиммунного генеза.

Интегральный трансмембранный белок CD68 экспрессируется на разных типах клеток, однако особенностью данного биомаркера является высокая специфичность в отношении макрофагов. Связываясь с ткане — или органоспецифичными селектинами и лектинами с помощью сильно гликолизированного внеклеточного домена, белок позволяет макрофагу заякориваться на конкретном участке ткани. Установлено, что макрофаги легкого принимают активное участие в защите организма от микобактерий, обладая фагоцитарной и бактерицидной активностью, регулируя секреторную и пролиферативную активность других типов клеток, иницируя и регулируя иммунный ответ на инфекцию, что обуславливает их важную роль в купировании инфекции или в развитии хронического воспаления.

Оценка и сравнение экспрессии белка CD68 на макрофагах, расположенных в очагах воспаления, при туберкулезе и саркоидозе позволит сделать вывод об информативной значимости этого молекулярного биомаркера в качестве дифференциального маркера для диагностики данных заболеваний.

Целью работы являлось определение экспрессии белка CD68 в ткани легкого при саркоидозе и на разных этапах формирования гранулем при туберкулезном воспалении легких.

Материалы и методы. В качестве материала для проведения исследования были использованы гистологические парафиновые блоки с тканями легких оперированных пациентов с диагностированным туберкулезом и саркоидозом органов дыхания. Для проведения работы для каждого пациента отбирали образцы легочной ткани, содержащие туберкулемы и эпителиоидно-клеточные гранулемы, с морфологическим определением степени активности воспалительного процесса по классификации Б.М. Ариэля.

Далее, с помощью иммуногистохимического метода исследований идентифицировали белок CD68. Последующее исследование окрашенных образцов проводили с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX73 и программного обеспечения CellSens Standard, где для дальнейшего анализа выбирались определенные струк-

туры тканей — гранулемы и стенки туберкулем. Для количественной оценки экспрессии искомого белка в программе ImageJ подсчитывали площадь, занимаемую иммунопозитивными клетками, и общую площадь клеток в поле зрения, из отношения которых определяли относительную площадь экспрессии данного биомаркера.

Результаты. При обработке полученных результатов были обнаружены различия в уровнях экспрессии мембранного рецептора при разных степенях активности туберкулезного процесса. Средняя относительная площадь экспрессии CD68 внутри гранулемы составляет 3,54% при 2 степени активности туберкулеза, 1,76% при 3 степени, 2,21% при 4 степени и 1,71% при 5 степени. Статистических различий в уровнях экспрессии белка CD68 между группами пациентов не обнаружено.

Средняя относительная площадь экспрессии CD68 в стенке туберкулемы составляет 6,07% при 2 степени активности туберкулеза, 5,99% при 3 степени, 4,85% при 4 степени и 1,54% при 5 степени. При этом установлены статистически значимые различия при $p \leq 0,05$ между уровнями экспрессии данного белка при 3, 4 и 5 степенях активности.

Также, экспрессия белка CD68 была обнаружена в 87,5% изученных случаев саркоидоза легких, причем относительная площадь экспрессии в этой группе пациентов находилась в диапазоне от 1,62 до 6,07%. Статистических различий в уровнях экспрессии данного биомаркера между группами пациентов с туберкулезом и саркоидозом легких не выявлено.

Заключение. Проведенные исследования демонстрируют участие белка CD68 в гранулематозном воспалении как инфекционного, так и неинфекционного генеза. Отсутствие статистических различий в уровнях экспрессии CD68 при туберкулезе и саркоидозе легких не позволяет рассматривать этот биомаркер для дифференциальной диагностики данных заболеваний. Продолжение исследований будет акцентировано на изучении других молекул нейроиммуноэндокринной регуляции, так как определение экспрессии сигнальных молекул в органах и тканях при различной патологии является перспективным и многообещающим направлением для разработки эффективных методов прижизненной диагностики и лечения социально-значимых заболеваний.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОРНК С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИМЕРИЗАЦИИ

Сахабутдинова А.Р., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В., Гарафутдинов Р.Р.

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН (ИБГ УФИЦ РАН), Уфа, Россия

Введение: МикроРНК (миРНК) — класс малых некодирующих РНК, играющих ключевую роль в регуляции сигнальных путей и реакций организмов на стресс [1]. Концентрация миРНК в биологических тканях варьирует в наномолярном диапазоне, поэтому для оценки их содержания требуется амплификация. Однако зрелые миРНК — небольшие молекулы, определение которых мето-

дами классической ПЦР-амплификации невозможно.

Цель исследования: разработка нового подхода к обнаружению миРНК с помощью нового типа реакции изотермической амплификации.

Материалы и методы. Для экспериментов были взяты два сорта мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) — Омская 35 и Казахстанская 10. Проростки пшеницы выращивали в 10%

растворе Хогланда-Арнона в климатической камере КС-200 СПУ (Россия) при температуре 20/24°C (ночь/день). Изоляты *S.nodorum* содержали на картофельно-глюкозном агаре при 21°C и 12-часовом фотопериоде. 6-дневные сеянцы опрыскивали суспензией спор *S.nodorum* в 0.02%-ном Твин-20. Контрольные сеянцы опрыскивали 0.02%-ным Твин-20. Сосуды с проростками закрывали и переносили в камеру выращивания с контролируемыми условиями. Развитие симптомов наблюдалось на отдельных листьях пшеницы, помещенных в чашки Петри. Области поражения регистрировали с помощью камеры стабилизации изображения SP-800UZ (Olympus) на шестые сутки. Образцы листьев выделяли от здоровых и зараженных растений и фиксировали в жидком азоте. МикроРНК экстрагировали из 100 мг тканей листьев с помощью набора для выделения микроРНК («Биолабмикс», Россия). Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре ND-1000 (NanoDrop Technologies). Полиаденилированные микроРНК получали, как описано в [3]. Фосфорилирование микроРНК проводили в соответствии с обычным протоколом. Фосфорилированные микроРНК лигировали с адаптором Adp с помощью РНК-лигазы T4, реакционные смеси инкубировали 18 ч при комнатной температуре с последующей инактивацией лигазы. Полученные продукты лигирования использовали для мультимеризации без дополнительной очистки. Для контрольных экспериментов такую же процедуру лигирования проводили для гетеродуплексов ДНК-РНК, полученных отжигом фосфорилированных синтетических микроРНК и соответствующих праймеров Pr.

Аmplification (мультимеризацию) проводили согласно [2]. Количественное определение микроРНК пшеницы с использованием ПЦР в реальном времени проводили как описано в [3].

Основные результаты. Нами разработан новый подход к обнаружению зрелых микроРНК, основанный на мультимеризации (ММ). На первом этапе микроРНК лигируют с адаптором путем нематричного лигирования с использованием РНК-лигазы T4, в результате чего получается химерный ДНК/РНК-продукт. Праймер Pr отжигается на РНК-части химеры и удлиняется с помощью ДНК-полимеразы с последующим образованием первичного ампликона (1L). На 5'-конце адаптора находится олигонуклеотидный мотив, идентичный мотиву на 3'-конце микроРНК, вводимый для облегчения «дыхания» цепей и образования иницирующего комплекса, который далее приводит к первому мультимерному продукту 2L. Адаптор одновременно служит вторым праймером при ампликации. Генерация дуплексов длиной >2L переводит реакцию в экспоненциальный режим.

Применимость ММ для обнаружения специфических микроРНК сначала изучалась на синтетических микроРНК. Для этого синтезировали пять микроРНК растений пшеницы *Triticum aestivum*, а также адаптор Adp и праймер Pr, комплементарный Tae-miR159. Молекулы микроРНК идеально подходят для проведения ММ благодаря малому конечному размеру, что позволяет генерировать НК-структуры, обеспечивающие эффективную ММ. Синтетические микроРНК предварительно фосфорилировали, далее лигировали с Adp и проводили ММ. Значения порогового времени Tt, полученные для образцов разного типа, свидетельство-

вали о высокой специфичности обнаружения микроРНК-мишени. Значения Tt для специфической амплификации находились в пределах 30-50 мин, а для образцов контроля составляли >80 мин.

Далее были проведены эксперименты с использованием образцов микроРНК, выделенных из *T.aestivum*. Для этого были взяты два сорта мягкой пшеницы с разной устойчивостью к грибной инфекции: Омская 35 (устойчивый к *Septoria nodorum*) и Казахстанская 10 (восприимчивый к *S.nodorum*). Хотя нативные микроРНК содержат 5'-фосфат, микроРНК пшеницы дополнительно фосфорилировали, чтобы обеспечить более высокую эффективность ММ. Калибровочные образцы, содержавшие 1.5·10⁷-1.0·10⁹ копий фосфорилированной Tae-miR159, получали серийными разведениями исходного раствора. Эксперименты позволили количественно определить содержание Tae-miR159 во всех образцах растений пшеницы. Было обнаружено примерно 3-кратное увеличение количества Tae-miR159 для инфицированных растений, что свидетельствует об участии этой микроРНК в ответ на заражение *S.nodorum*. ММ позволила количественно оценить содержание микроРНК в пределах привычных диапазонов концентраций, обеспечив предел обнаружения на уровне 107 копий мишени (~20 пМ).

Для верификации полученных данных содержание Tae-miR159 оценивали также методом ПЦР, как описано в [3]. Для этого методика ПЦР-амплификации была несколько модифицирована путем исключения стадии обратной транскрипции и использования ДНК-полимеразы Hemo KlenTaq, для которой ранее была показана возможность амплификации коротких РНК-матриц [4]. Показано, что метод на основе ПЦР показывает более высокое содержание мишени, вероятно, за счет завышения уровня микроРНК в результате ко-ампликации ее предшественников (при— и пре-микроРНК).

Заключение: Предложен новый метод определения специфических микроРНК, основанный на мультимеризации. Метод выявляет только зрелые микроРНК, формы-предшественники (при— или пре-микроРНК) не вовлекаются в анализ. Реакция протекает в изотермических условиях, не требует стадии обратной транскрипции и флуоресцентных зондов. Метод является количественным, обеспечивая чувствительность на уровне ~20 пМ.

Благодарности: Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант № 22-24-00235).

Цитированная литература:

1. MicroRNA: From Bench to Bedside / Xiao J. (Ed.) // 1st ed., Academic Press, 2022
2. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R., The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase // Appl. Biochem. Biotechnol. 190 (2020) 758-771.
3. Gupta O.P., Permar V., Koundal V., Singh U.D., Praveen S. MicroRNA regulated defense responses in *Triticum aestivum* L. during *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* infection // Mol. Biol. Rep. 2012. 39(2). 817-824.
4. Sakhabutdinova A.R., Gazizov R.R., Chemeris A.V., Garafutdinov R.R. Reverse transcriptase-free detection of viral RNA using Hemo KlenTaq DNA polymerase // Anal. Biochem. 2022. 659. 114960.

ГИДРОГЕЛЕВЫЕ БИОЧИПЫ — ИНСТРУМЕНТЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ БИОМАРКЕРОВ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Грядун Д.А., Иконникова А.Ю., Дементьева Е.И., Поляков С.А., Филиппова М.А., Савватеева Е.Н., Антонова О.В., Кулагина Е.В., Емельянова М.А., Кандинов И.Д., Кравцов Д.В., Шаскольский Б.Л., Зименков Д.В., Чудинов А.В., Заседателев А.С.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия

Введение. Создание новых методов анализа биополимеров невозможно без проведения широкого спектра исследований, направленных на идентификацию достоверных биомаркеров, характеризующих патологический процесс или возбудителя инфекции. Актуальность проблемы определяется социальной значимостью онкологических, аутоиммунных, инфекционных и других заболеваний. Разработка, совершенствование и внедрение методов анализа последовательностей нуклеиновых кислот и маркеров белковой природы является приоритетной задачей молекулярной диагностики.

Цель/задачи. Развитие технологии гидрогелевых биочипов ИМБ РАН для многопараметрического анализа ДНК— и белковых маркеров социально-значимых заболеваний, разработка и внедрение в клиническую лабораторную диагностику медицинских изделий на основе биочипов.

Материалы и методы. Ключевым отличием технологии биочипов, созданной в ИМБ РАН, является иммобилизация молекулярных зондов в трехмерных элементах гидрогеля, ковалентно закрепленных на плоской подложке. В зависимости от типа биочипа диаметры гелевых ячеек варьируют от 50 до 300 мкм, а расстояния между ячейками от 100 до 500 мкм. Количество ячеек на биочипе зависит от задачи и составляет от нескольких десятков до нескольких тысяч.

Исследование кинетики и термодинамики гибридизации фрагментов ДНК показало, что использование коротких (до 25 н.о.) олигонуклеотидов обеспечивает эффективную дискриминацию однонуклеотидных замен, а иммобилизация в трехмерных гелевых элементах позволяет значительно увеличить интенсивность положительных сигналов и уменьшить статистический разброс по сравнению с двумерными микрочипами.

Одновременно проводимые в каждом из элементов биочипа реакции гибридизации и/или амплификации нуклеиновых кислот обеспечивают параллельную идентификацию множества геномных мишеней, тем самым реализуя принцип многопараметрического анализа. Достигнут значительный прогресс в аналитической чувствительности анализа за счет создания процедуры мультиплексной ПЦР, обеспечивающей одновременную амплификацию десятков фрагментов геномов, а также благодаря синтезу новых красителей и оптимизации флуоресцентного маркирования.

Биочипы могут также одновременно содержать ячейки с иммобилизованными белками, олигосахаридами и/или олигонуклеотидами, причем в каждой отдельной ячейке может быть иммобилизован как индивидуальный молекулярный зонд, так и их комбинации в зависимости от

целей эксперимента. Взаимодействие между различными классами молекул может происходить по типу «рецептор — лиганд», «антиген — антитело», «фермент — субстрат» и т.д. Находящийся в ячейке иммобилизованный лиганд белковой или небелковой природы, при инкубации биочипа с образцом, содержащим анализируемые соединения, образует специфический комплекс. На этой стадии происходит разделение анализируемых соединений из смеси по их способности к специфическому связыванию с иммобилизованными лигандами, что позволяет проводить одновременный анализ нескольких биологических объектов на одном биочипе, реализуя принцип мультиплексного иммуноанализа. Создано несколько поколений универсальных флуоресцентных анализаторов, последнее из которых обеспечивает измерение интенсивности сигналов элементов биочипа при длинах волн от 380 нм до 850 нм, позволяя проводить качественный и количественный анализ с точностью $\pm 5\%$.

Результаты. Универсальная платформа гидрогелевых биочипов позволила разработать, испытать и внедрить в практику широкий спектр приложений — от идентификации молекулярных детерминант лекарственной устойчивости микроорганизмов и вирусов, выявления мишеней в геноме человека, ассоциированных с риском и развитием злокачественных опухолей и эффективностью терапии, до мультиплексного иммуноанализа белковых маркеров в образцах сыворотки крови пациента.

Так, разработаны биочипы для идентификации генетических детерминант устойчивости возбудителя гонококковой инфекции к актуальным антимикробным препаратам — цефтриаксону и азитромицину. Создана математическая регрессионная модель, позволяющая точно установить значение минимальных ингибирующих концентраций цефтриаксона и, соответственно, уровень устойчивости, определяющий назначение препарата пациенту, в зависимости от мутаций в геноме возбудителя. Экспериментальная валидация биочипа и регрессионной модели на российской коллекции из 448 штаммов возбудителя показало совпадение результатов с микробиологическим методом для 94,4% образцов. С использованием специализированного биочипа впервые в России выявлен кластер азитромицин-устойчивых изолятов *Neisseria gonorrhoeae*, характеризующихся мутациями и мозаичными аллелями генов *mtrR* и *mtrD*, кодирующими эффлюксный насос MtrCDE. Филогенетический анализ показал, что причиной возникновения в России нового варианта гонококка, устойчивого к макролидам, является трансграничный перенос резистентного штамма со специфическими генетическими детерминантами.

Совместно с Психиатрической клинической больницей № 1 им. Н.А. Алексеева разработан и испытан метод анализа генетических маркеров для оценки полигенного риска (ПГР) развития деменций альцгеймеровского типа на основе олигонуклеотидного гидрогелевого биочипа. Впервые при анализе образцов геномной ДНК российской популяции, в основном пациентов г. Москвы, были получены и рассчитаны значения ПГР, построено их распределение, определены генотипы гена *APOE*, позволившие статистически значимо установить, что значения четвертого квартиля ПГР и наличие аллеля $\epsilon 4$ гена *APOE* являются значимыми предикторами и характеризуют повышенный риск развития болезни Альцгеймера.

Совместно с НМИЦ эндокринологии Минздрава России создан метод одновременной детекции органо-специфических аутоантител (АТ), антител к интерферонам I типа интерлейкину-22, ассоциированных с развитием

аутоиммунных эндокринопатий, таких как аутоиммунные формы нарушения углеводного обмена (сахарный диабет 1 типа и др.), аутоиммунные полигландулярные синдромы (АПС), аутоиммунные заболевания щитовидной железы, аутоиммунная надпочечниковая недостаточность и др. Показано, что для АПС-1 характерно наличие по крайней мере двух АТ к цитокинам (Sp 99,5%, Se 100%). В настоящее время метод расширен для выявления 26 АТ — маркеров развития аутоиммунных эндокринных и коморбидных заболеваний.

Заключение/выводы. Технология гидрогелевых биочипов продолжает оставаться эффективным инструментом молекулярного профилирования множества клинически значимых маркеров возбудителей и причин социально-значимых заболеваний, спасая жизнь сотням больных и обеспечивая экономию бюджетных средств при лечении.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ СОВМЕСТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОРНК MIR-155, MIR-15A И МРНК ROR1 ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Столяр М.А.^{1,2}, Галанин В.В.³, Горбенко А.С.^{1,2}, Бахтина В.И.^{3,4} Ольховский И.А.^{1,2}

¹ Красноярский филиал ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Красноярск, Россия

² ФМЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

³ КГБУЗ Красноярская краевая клиническая больница, Красноярск, Россия

⁴ Красноярский государственный медицинский университет, Красноярск, Россия

Введение. Известны изменения концентрации молекул мРНК гена ROR1 [1], а также микроРНК miR-155 [2] и микроРНК miR-15a [3] в лейкоцитарных клетках крови при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ). Современные технологии микрочипов и секвенирования могут одновременно обнаружить несколько тысяч различных молекул РНК, вместе с тем они остаются малодоступными для большинства региональных клиник. С другой стороны, в большинстве случаев для принятия клинических решений достаточно информации об ограниченном числе биомаркеров. В доступной литературе не описано использование широко распространённых методов ОТ-ПЦР для одновременного количественного определения мРНК и микроРНК. Из практики лабораторных исследований известно, что проведение ПЦР в мультиплексном варианте определения разных маркеров в одной аналитической постановке имеет ряд преимуществ перед ПЦР в отдельных аналитических сериях для каждого отдельного маркера, а именно: снижение риска контаминации образцов, уменьшение расхода реактивов, сокращение времени проведения анализа и постановки диагноза. Кроме того, стандартизованное одновременное определение отдельных маркеров позволяет получать дополнительные диагностические критерии, основанные на соотношении их концентраций более точно, чем при использовании разных тест систем и технологий.

Цель настоящей работы заключалась в использовании мультиплексного набора реактивов для количественного определения мРНК ROR1, miR-155 и miR-15a при тестировании образцов крови пациентов с ХЛЛ.

Материалы и методы. Выделение мРНК из лейкоцитов и микроРНК из плазмы венозной крови, обратную транскрипцию и мультиплексную ПЦР-ПВ выполняли в соответствии с патентом RU 2802064C1. В работе использовали анонимные образцы крови 15 пациентов с ХЛЛ, как с первично выявленным заболеванием, так и находящихся на стандартной терапии FDR. В качестве контрольной группы использовали образцы крови пациентов, не имеющих онкологических заболеваний.

Результаты. Мультиплексная диагностическая тест-система продемонстрировала удовлетворительные характеристики параметров эффективности ПЦР (95%, 102%, 85%) для мРНК ROR1, miR-155 и miR-15a соответственно. При исследовании образцов крови было подтверждено значимые изменения уровней экспрессии мРНК ROR1, miR-155 и miR-15a в образцах крови у первичных пациентов по сравнению с контрольной группой и снижение данного маркера в процессе терапии.

Заключение. Мультиплексная ПЦР-ПВ тест-система для выявления мРНК ROR1, miR155 и miR15a позволяет количественно определить их уровень в крови в одной аналитической серии. Результаты тестирования полезны для прогноза и оценки эффективности терапии пациентов с ХЛЛ.

Список литературы:

1. Aghebati-Maleki L, Shabani M, Baradaran B, Motallebnezhad M, Majidi J, Yousefi M. Receptor tyrosine kinase-

like orphan receptor 1 (ROR1): An emerging target for diagnosis and therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2017;88:814-822.

2. Due H., Svendsen P., Bødker J., Schmitz A., Bøgsted M., Johnsen H.E. et al. miR-155 as a Biomarker in B-Cell Malignancies.

BioMed Research International. 2016;2016: 1-14.

3. Braga TV, Evangelista FCG, Gomes LC, Araújo SSDS, Carvalho MDG, Sabino AP. Evaluation of MiR-15a and MiR-16-1 as prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:864-869.

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА HENDRA НА ОСНОВЕ CAS12A/RPA

Капитонова М.А.^{1,2}, Шабалина А.В.¹, Дедков В.Г.¹, Долгова А.С.¹

¹ Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

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

Введение. Вирус Hendra является РНК-содержащим вирусом, принадлежит роду *Henipavirus*, семейству *Paramyxoviridae*, относится к I группе патогенности и наряду с вирусом *Nipah* считается зоонозным патогеном, вызывающим тяжелые и часто смертельные неврологические и респираторные заболевания [1]. Начиная с изоляции вируса в 1994 году в Австралии, Hendra ежегодно вызывает вспышки заболеваемости среди лошадей и может передаваться человеку при тесном контакте с больным животным. Естественным резервуаром Hendra считаются летучие лисицы (род *Pteropus*, семейство *Pteropodidae*).

В данной работе предложен способ детекции вируса Hendra, основанный на платформе DETECTR с использованием Cas12a. Особенностью данного белка является способность к коллатеральной нуклеазной активности. Направляемый гидовой РНК специфической к заданной мишени, Cas12a может распознать последовательность дцДНК и расщеплять не только мишень-дцДНК, но и все оцДНК, находящиеся в растворе. Таким образом, при использовании оцДНК-зондов с флуорофором и гасителем становится возможна детекция дцДНК по флуоресцентному сигналу от расщепленных зондов [2].

Цель и задачи. Целью данной работы является разработка системы детекции вируса Hendra на основе диагностической платформы с применением эффекторного белка LbaCas12a, совмещенной с изотермической рекомбиназной полимеразной амплификацией (RPA) в одной пробирке. В связи с этим были поставлены и решены следующие задачи: 1) подбор гидовых РНК (гРНК) для Cas12a на мишень-последовательность фрагмента вируса Hendra; 2) тестирование и оптимизация протоколов детекции Cas12a; 3) подбор и оптимизация праймеров для RPA; 4) совмещение систем амплификации и детекции в одной пробирке.

Материалы и методы. Для детектирования Hendra *henipavirus* выбрана последовательность GenBank NC_001906.3, участок от 672 до 831 (160 пар нуклеотидов).

Протокол Cas-детекции

На общий объем реакции 25 мкл добавляются 2,5 мкл 10X NEBuffer 2.1 (New England Biolabs), 2,5 мкл гРНК с концентрацией 1 мкМ, 2,5 мкл Lba Cas12a (Cpf1) (New England Biolabs) с концентрацией 1 мкМ, 2,5 мкл флуоресцентного зонда 5'—FAM—TTATT—BHQ1-3' в концентрации 10 мкМ. Итоговые концентрации гРНК и Cas12a после оптимизации условий составляют 100 нМ. Далее добавляется 1 мкл ма-

трицы ДНК или 1 мкл воды в случае образцов отрицательного контроля (NTC). Концентрация целевой ДНК определялась при помощи NanoDrop. Детекция осуществляется в изотермических условиях при +40° путем регистрации сигнала флуоресценции красителя FAM в амплификаторах Real-time CFX96 Touch (BioRad) или Rotor Gene Q (QIAGEN).

Проведение RPA

Смесь для RPA составлялась согласно стандартному протоколу из набора TwistAmp® Liquid Basic в пересчете на 20 мкл реакционной смеси при добавлении 1 мкл матрицы ДНК. Смесь инкубировалась 30 минут при +40°, после чего продукты амплификации без дальнейшей очистки были нанесены на агарозный 2% гель для проведения электрофореза.

Совмещение Cas/RPA

Наиболее эффективным способом совмещения амплификации и детекции в одной пробирке оказалось предварительное разделение смесей: 14 мкл RPA с праймерами и MgOAc, инициирующим реакцию амплификации, добавляется на дно пробирки, а 10 мкл смеси с Cas12a, гидовой РНК и флуоресцентными зондами — на крышку пробирки. Далее к RPA смеси для начала реакции добавляется 1 мкл матрицы, смесь инкубируется 30 минут при температуре +40° для прохождения амплификации. После этого обе смеси в пробирке перемешиваются, и флуоресцентный сигнал от Cas-системы регистрируется при +40° в течение 45 минут при помощи амплификатора реального времени.

Основные результаты. Подобрана наиболее оптимальная гРНК, при которой Cas детекция дает наибольший сигнал от расщепления зондов и которая совместима с RPA праймерами для исключения неспецифических реакций. На основе яркости полос на окрашенной электрофореграмме продуктов амплификации после RPA были выбраны наиболее эффективные праймеры. Совмещенная диагностическая платформа Cas/RPA протестирована на преамплифицированной матрице ДНК. Чувствительность данного метода детекции вируса Hendra составила 103 копий/мкл при добавлении 1 мкл матрицы на 15 мкл реакции RPA и 10 мкл смеси Cas-системы.

Заключение. Продемонстрированная в ходе данной работы диагностическая платформа показала свою работоспособность на ДНК матрице — фрагменте вируса Hendra. Найден эффективный способ совмещения амплификации и детекции в одной пробирке, исключаящий

возможность контаминации поверхностей продуктами РРА. Изотермичность прохождения анализа дает преимущество перед стандартными методами детекции на основе ПЦР из-за отсутствия необходимости использования амплификаторов реального времени.

Работа выполнена при поддержке государственной программы Российской Федерации «Обеспечение химической и биологической безопасности Российской Федерации».

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ β -АМИЛОИДНЫХ ПРИОННЫХ СТРУКТУР В ТКАНИ ЦНС ПРИ БОЛЕЗНИ ГЕРСТМАННА-ШТРЕУССЛЕРА-ШЕЙНКЕРА

Асташонок А.Н., Полещук Н.Н.

ГУ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Введение. Прионные заболевания или трансмиссивные губкообразные энцефалопатии рассматриваются как группа быстро прогрессирующих нейродегенеративных болезней, поражающих как животных, так и человека. Синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера (СГШШ) — наиболее редкое заболевание, относящееся к генетически детерминированным формам прионных заболеваний человека. Частота встречаемости — 1:10 000 000. В данной работе впервые в Беларуси описан случай редкого прионного заболевания (СГШШ), охарактеризована клиническая и патоморфологическая картина, сконструированы биочипы для детекции патологических β -амилоидов.

Цель работы: Охарактеризовать патоморфологические признаки, провести индикацию и идентификацию патологических белковых структур, формируемых в ЦНС при СГШШ.

Материалы и методы. Постмортальное исследование ткани ЦНС было проведено на секционном материале пациента (возраст — 57 лет) с клиническим диагнозом «болезнь Крейтцфельда-Якоба с когнитивной дисфункцией с выраженным стволовым глазодвигательным синдромом». Для гистологического исследования вырезали фрагменты из наиболее информативных участков коры больших полушарий головного мозга (поля 1, 4, 10, 17, 21, 22, 39), мозжечка, таламуса, гиппокампа, стриопаллидарной системы, спинного мозга, которые фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина в течение 2 недель с последующей заливкой в парафин. Из парафиновых блоков приготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином, по Ван-Гизону, Клювер-Барреру.

Выделение прионного белка из образцов мозговой ткани ЦНС. Для получения разноразмерных β -амилоидов использовали метод Frank O. Bastian, 2005. Далее образцы разделяли на отдельные аликвоты и хранили при -20°C до использования.

Атомно-силовая микроскопия. Топографические изображения различных патологических белковых структур получали на микроскопе Nanoscope IIIa MultiMode (Bruker, США), оборудованном J-сканером.

Основные результаты. При гистологическом анализе

Литература

1. Li, H., Kim, J. V., Pickering, B. S. (2023) Henipavirus zoonosis: outbreaks, animal hosts and potential new emergence, *Frontiers in microbiology*, 14, 1167085.

2. Das A., Goswami H.N., Whymys C.T., Sridhara S., Li H. (2022) Structural principles of CRISPR-Cas enzymes used in nucleic acid detection *Journal of Structural Biology*, 214, 107838.

отмечалось тяжелая диффузная атрофия головного мозга и коры мозжечка, в дополнение к обширному поражению нижележащего белого вещества, которое было разрежено и коллабировано. Базальные ганглии и таламус также были значительно уменьшены в размерах. Отмечалась обширная потеря нейронов, реактивный глиоз и спонгиоз как в коре головного мозга, так и в коре мозжечка, с обширной потерей клеток Пуркиньи и клеток зернистого слоя. В сером веществе головного мозга наблюдались набухшие нейроны и выраженный астроглиоз.

Детекция протеазорезистентных амилоидов на сенсорных участках поверхности. Эффективное связывание «антиген-антитело» (PrP_{sc} -антитело) было отмечено при экспозиции исследуемых образцов в течение 180 мин при температуре 37°C . При данных условиях эксперимента с использованием АСМ установлено образование специфических комплексов (протеазорезистентный PrP)+антитело. Наиболее многочисленным типом белковых наноразмерных элементов были «прионных палочки» и глобулы. Палочки представляли собой стержнеподобные структуры длиной (l) — 100-200 нм, шириной (d) — \square 20 нм и высотой — 4-5 нм. Вторым типом белковых структур были глобулы. Они характеризовались разрозненными или сцепленными в виде цепочек сферами диаметром 10-25 нм. На заключительном этапе с использованием высокоразрешающей АСМ мы исследовали более композиционно сложные структуры, формируемые прионом PrP . Установлено, что высота β -амилоидной фибриллы при анализе микропрофилей сечения, проведенных в различных участках поверхности, соответствовала значениям $10 \pm 1,7$ нм. Параметр ширины при этом не превышал среднего диапазона 25-27 нм.

Заключение. Установлены патогномоничные признаки, специфические для СГШШ, что позволило оценить выраженность дистрофических процессов в ЦНС. Из образцов ткани мозга выделены инфекционные β -амилоиды и дана их наноскопическая характеристика. Выявлены формы амилоидов, различающиеся по высоте (h) и шероховатости поверхности, что свидетельствует о гетерогенности в укладке белковых кластеров в составе структур прионов.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДЕТЕКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ОСНОВЕ 4WJ ДНК-СЕНСОРОВ И АГРЕГАЦИИ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ

Березовская М.Ю., Брюккель А.Г., Быковская М.А., Горбенко Д.А.

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Введение: Ранняя диагностика инфекционных заболеваний является необходимой для своевременного начала терапии. В наши дни туберкулез излечим и поддается профилактике, однако является одной из 10 основных причин смерти и основной причиной смерти, обусловленной каким-либо одним возбудителем инфекции (опережая ВИЧ/СПИД). Существует множество способов диагностики бактериальных патогенов, таких как культуральные методы или ПЦР (полимеразная цепная реакция) в реальном времени, однако в большинстве случаев вышеперечисленные методы либо слишком продолжительные (культуральный метод), либо требуют дорогостоящего оборудования, такого как амплификатор для ПЦР. Анализ нуклеиновых кислот — базовый принцип диагностики патогенных инфекций. На сегодняшний момент необходимы РОСТ (point-of-care testing) системы, которые могут быть доступны в условиях отсутствия обученного персонала и специального оборудования, такого как количественная полимеразная цепная реакция, ввиду чего использование новой концепции биосенсоров может быть разумным решением.

Цели и задачи: Целью данной работы было показать способность детекции фрагмента ДНК патогена *M. Tuberculosis* с помощью 4-Way-Junction (4WJ) ДНК-сенсора путем агрегации магнитных наночастиц. Для это было необходимо выполнить следующие задачи: выполнить дизайн ДНК-сенсора, осуществить пришивку олигонуклеотида к магнитной наночастице и провести детекцию.

Материалы и методы: В представленной работе бинарный гибридационный ДНК-зонд был использован для обнаружения фрагмента ДНК (аналита) *M. Tuberculosis* (ген HgA1), отвечающего за обретение антибиотикорезистентности. Благодаря структуре стержневой петли, гибридационный зонд имеет повышенную селективность, кото-

рую обеспечивает «длинное» аналит-связывающее плечо и способен распознавать даже однонуклеотидные замены (обеспечивается «коротким», нарушающим формирование комплекса, плечом). В основе используемого в работе ДНК-зонда лежит конструкция типа 4-way junction (4WJ), состоящая из двух цепей ДНК и гибридационного зонда с магнитной наночастицей, конъюгированной на 5'-конце (UMB_NP) [1]. Обе последовательности ДНК состоят из двух частей — комплементарной аналиту и комплементарной МВ. При добавлении аналита формируется надмолекулярный комплекс, стягивающий магнитные наночастицы на поверхность стрептавидиновой матрицы. В работе использовали магнетит Fe₃O₄. Реакцию проводили в присутствии 50 мМ MgCl₂, 50 мМ Tris HCl при комнатной температуре.

Результаты: Было показано, что наночастицы магнетита могут быть агрегированы на поверхности стрептавидина при добавлении 2,5 μМ аналита. Реакция проводится за 5 минут и может быть зарегистрирована невооруженным глазом. Динамическое рассеяние светом (DLS) показало смещение в области размеров в сторону образования комплексов 105 нм, от расчетного размера нч в 100 нм.

Заключение: В ходе данной работы был подобран оптимальный дизайн ДНК-зонда с пределом обнаружения 21,2 нМ, была осуществлена пришивка т-руки зонда к магнитной наночастице глутаральдегидным методом, а также была совершена детекция фрагмента ДНК *M. tuberculosis* путем агрегации магнитных наночастиц.

Авторы исследования благодарны Министерству образования и науки Российской Федерации № FSER-2022-0009 и программе «Приоритет 2030» за финансовую поддержку.

1. Kolpashchikov, D. M. (2006). A binary DNA probe for highly specific nucleic acid recognition. *Journal of the American Chemical Society*, 128(32), 10625-10628.

РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ АНАЛИТОВ ДВУХЦЕПОЧНОЙ ДНК ПРИ 37°C

Бушаев А.А.¹, Атие М.¹, Рубель М.С.¹, Колпащиков Д.М.^{2,3}

¹ Университет ИТМО, Лаборатория Растворной химии передовых материалов и технологий, Санкт-Петербург, Россия

² Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA

³ Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA

Введение. ДНК-наномашина (ДНМ) представляет собой объединение некоторого числа цепей ДНК («рук»), которое претерпевает структурные перестройки в ответ на присутствие специфического аналита [1]. Было доказано, что ДНМ являются чувствительным и селективным

методом диагностики [2]. Недостатком, препятствующим их практическому использованию, является то, что существующие машины не работают в физиологических условиях. Введение в их структуру искусственно синтезированных замкнутых нуклеиновых кислот (LNA) может

помочь повысить чувствительность наномашин в данных условиях.

Наша ДНК-наномашина оснащена каталитическим ядром из 10–23 дезоксирибозимов, разделенных между двумя руками Dza и Dzb. Наномашина работает следующим образом: руки внедряются в двухцепочечную ДНК и образуют комплекс ДНМ-двухцепочечная ДНК, при образовании которого каталитическое ядро из 10–23 дезоксирибозимов становится каталитически активным и расщепляет флуорофор и меченный тушителем субстрат (F-sub), что, в свою очередь, приводит к появлению флуоресцентного сигнала, который мы можем обнаружить с помощью детектора.

Чтобы сделать возможной работу ДНМ в физиологических условиях, мы решили внедрить в структуру рук LNA-модифицированные нуклеотиды. Этот выбор обусловлен тем, что данные нуклеотиды имеют повышенное сродство к анализу благодаря особенностям своей молекулярной структуры и они могут быть использованы вместе с нуклеотидами ДНК или РНК в составе олигонуклеотида. Замкнутая нуклеиновая кислота (LNA) представляет собой модифицированный нуклеотид РНК, в котором рибозный фрагмент модифицирован дополнительным мостиком, соединяющим 2'-кислород и 4'-углерод. Данные структурные особенности LNA-модифицированных нуклеотидов обеспечивают улучшенную специфичность и сродство при спаривании оснований в качестве мономера или компонента олигонуклеотида [3].

Цель. Данное исследование направлено на разработку и создание высокоселективного зонда с использованием дезоксирибозимов и LNA-модифицированных нуклеотидов для анализа двухцепочечной ДНК и дальнейшую разработку этого зонда для использования при комнатной температуре.

Задачи:

1. Оценить влияние количества и положения LNA-модифицированных нуклеотидов в руках, связывающихся с анализом, на эффективность анализа двухцепочечной ДНК.
2. Дать оценку влиянию наличия ДНК каркаса на эффективность анализа двухцепочечной ДНК.
3. Протестировать разработанные зонды на различ-

ных моделях ДНК, таких как: двухцепочечная ДНК, шпилька ДНК и ампликоны ПЦР.

Основные результаты. Для подтверждения работоспособности ДНК-наномашины, содержащей LNA-модифицированные нуклеотиды, мы разработали ДНМ для обнаружения фрагмента двухцепочечной ДНК длиной 120 пар оснований. Данный фрагмент принадлежит папилломавирусной инфекции человека (ВПЧ-инфекции), вызываемой ДНК-вирусом семейства *Papillomaviridae* [4]. В ходе разработки было протестировано несколько дизайнов наномашин, различающихся количеством и положением LNA-модифицированных нуклеотидов, но они показали отрицательные результаты, то есть не обнаруживали целевую последовательность ДНК.

Заключение. Мы протестировали ряд различных ДНМ, как содержащих LNA-модификации, так и без них, чтобы изучить влияние положения и количества LNA-модифицированных нуклеотидов на стабилизацию ДНМ. Мы обнаружили, что замена обычных нуклеотидов ДНК на LNA-модифицированные в последовательностях рук ДНМ обеспечивает лучшую эффективность внедрения, о чём свидетельствовал флуоресцентный сигнал в 3 раза выше фонового уровня. Помимо этого, ДНМ обладает высокой избирательностью, поскольку она способна обнаруживать и различать различные однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП). В случае образцов, содержащих несовпадающие нуклеотиды, сигнал был близок к фоновому уровню. Эти результаты побуждают нас к дальнейшему тестированию ДНМ с помощью неденатурирующей флуоресцентной гибридизации *in situ* (nd-FISH).

Список литературы:

1. Kolpashchikov D.M. Evolution of Hybridization Probes to DNA Machines and Robots // *Accounts of Chemical Research*. 2019. V. 52. P. 1949–1956.
2. Lyalina T.A., Goncharova E.A., Prokofeva N.Y. and others. A DNA minimachine for selective and sensitive detection of DNA // *Analyst*. 2019. V. 144. P. 416–420.
3. Veedu R., Wengel J. *Medicinal Chemistry of Nucleic Acids*. 2011. P. 335–337.
4. Milner D.A. *Diagnostic Pathology: Infectious Diseases* // Elsevier Health Sciences. 2015. P. 40.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК КАК МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР СЕНЕСЦЕНЦИИ

Зятыков А.А.

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь

Актуальность. Основой персонифицированной медицины являются различные виды генетического тестирования, которые позволяют прогнозировать риск развития заболеваний и оценивать эффективность различных терапевтических вмешательств. Для лучшего понимания механизмов старения и поиска способов замедления данного явления, необходимо корректно выявлять сенесцентные клетки. Для этого могут быть использованы различные мар-

керы сенесценции (длина теломер, p16INK4a, SA-β-gal и др.).

Цель исследования: изучить способ использования количественного определения митохондриальной ДНК (мтДНК) как маркера клеточной сенесценции.

Методы. Выборка пациентов составила 51 человек, средний возраст 45,5±19,1 года. В качестве материала для исследования были использованы образцы цельной крови, хранящиеся в научно-исследовательской лаборатории уч-

реждения образования «Гомельский государственный медицинский университет». Выделение ДНК, для определения количества мтДНК проводили коммерческим набором. Для количественного анализа мтДНК во всех образцах необхо-

димо выявлять фрагмент гена мтДНК ND1 (NADH-дегидрогеназа) и фрагмент гена ядерной ДНК RPPH1 (Ribonuclease P RNA Component H1), который используется в качестве гена-нормализатора таблица 1.

ТАБЛИЦА 1. СТРУКТУРА ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ЯДНК И МТДНК

Название локуса	Название праймера, пробы	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
Mt-ND1 (мтДНК)	mtND 1-F	CCCTAAAACCCGCCACATCT	69
	mtND 1-R	GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT	
	mtNDprobe1	HEX-ATCACCTCTACATCACCGCCCG-BHQ1	
RPPH1-1 (ядНК)	RPPH1-F	AGCTGAGTGCCTGTCACT	108
	RPPH1-R	GAATCACCTCCCCGAAGCT	
	RPPH1probe	HEX-CCGCCTCTGGCCCTAGTCTCAGACC-BHQ1	

В данном исследовании применяли метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием зондов TaqMan. В каждой постановке ПЦР-РВ использовали дополнительные «отрицательный» и «положительный» образцы. Для получения воспроизводимых результатов не следует использовать разные методы экстракции, амплификаторы, а также изменять параметры реакционной смеси пробирок.

Результаты. Метод расчета отношения числа копий локусов мтДНК (mtND1) к яДНК (RPPH1) позволяет проводить количественный анализ мтДНК для изучения взаимосвязи данного генетического маркера с другими

изменениями и использовать в качестве дополнительного критерия определения групп риска по возраст-ассоциированным заболеваниям. Средняя величина отношения составила 283,10 (95% ДИ 180,6-317,24). Отношение мтДНК/ядНК имеет обратную умеренную корреляцию ($r=-0,46$) с хронологическим возрастом.

Выводы. Отношение мтДНК/ядНК может быть использовано как дополнительный критерий клеточной сенесценции с целью определения групп риска по возраст-ассоциированным заболеваниям. Полученный показатель требует дальнейшего изучения.

ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА ЛЕЙКОЦИТОВ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ КАРДИО-ВАСКУЛЯРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Плехова Н.Г., Черненко И.Н., Невзорова В.А., Семенова П.А.

ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, Владивосток, Россия

Для оценки риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) на настоящий момент используется более 200 факторов риска (ФР). Наибольшей прогностической ценностью обладает сочетание таких факторов до 4 и более, которое дают специфичность и чувствительность 99 и 96% соответственно. Существует необходимость внедрения современных технологий для прогнозирования развития кардиоваскулярных патологий. Среди существующих моделей прогнозирования исходов течения таких заболеваний привлекает внимание состояние митохондрий клеток, нарушение биологии которых вносит значительный вклад в снижение и потерю энергетического потенциала и может рассматриваться в качестве отправной точки преждевременного сердечно-сосудистого старения. Из доступных и информативных маркеров состояния биогенеза митохондрий клеток, а именно, в лейкоцитах, определен интерес вызывает изучение активности ферментов, которая находится в прямой зависимости от ишемии и процессов реперфузии при окислительном стрессе. Цель нашего исследования состояла в оценке состояния мембранного потенциала митохондрий и их фер-

ментов в лейкоцитах при остром коронарном синдроме. В исследование было включено 100 человек обоих полов, в возрасте от 35-ти до 65-ти лет, находившихся на лечении в первичном сосудистом отделении (ПСО) КГБУЗ Владивостокской клинической больницы № 1 по поводу острого коронарного синдрома (ОКС). Группу контроля составили 30 здоровых добровольцев сопоставимых с группой пациентов по основным антропометрическим показателям. В крови определяли тропонин I (TnI), предшественник мозгового натрийуретического пептида (NTproBNP), мембранный потенциал митохондрий (МПМ) и содержание ферментов (супероксиддисмутаза, СОД; сукцинатдегидрогеназа, СДГ; глутатионредуктаза, ГР) в лейкоцитах. Пациенты были разделены на 3 основные группы в зависимости от формы ОКС и подгруппы в зависимости от наличия сахарного диабета 2 типа (СД2). Обнаружено повышение количества лейкоцитов с нарушенным МПМ при всех вариантах ОКС, включая инфаркт миокарда (ИМ) и нестабильную стенокардию (НС). Установлена прямая связь между количеством клеток с нарушенным МПМ и содержанием TnI и NTproBNP в сыворотке крови при ИМ, при НС

только между количеством таких клеток и NTproBNP. Не обнаружено достоверного различия между показателями лейкоцитов с измененным МПМ крови у пациентов с ОКС в зависимости от наличия СД2. В лейкоцитах пациентов с ОКС вне зависимости от подъема или депрессии сегмента ST установлено значительное снижение содержания СДГ по сравнению со здоровыми (9-11 мкмоль/мл у здоровых и 1 мкмоль/мл у пациентов с ОКС, при $p < 0,001$), что свидетельствовало об истощении адаптационного ресурса митохондрий к внутриклеточной гипоксии. Также, при ОКС отмечается снижение содержания ГР (4 мкмоль/мл у здоровых лиц и 2-3 мкмоль/мл у пациентов, $p = 0,003$), что указывает на нарушение защитной функции клеток в ответ на повреждение продуктами перекисного окисления липидов при развитии ССЗ. Между подгруппами пациентов с ОКС в зависимости от наличия и отсутствия СД2 различий в содержании митохондриальных ферментов лейкоцитов (СДГ, ГР и СОД) и активности МДА не выявлено.

Заключение. Определено значимое снижение содержания ферментов СДГ и ГР в митохондриях лейкоци-

тов, степень выраженности которого зависела от клинической формы ОКС. У пациентов с инфарктом миокарда на фоне высоких показателей Tr1 вне зависимости от степени поражения и наличия или отсутствия СД2 уровень активности ГР был значимо ниже, чем у здоровых людей и, в незначительном диапазоне, отличался от пациентов с НС, тогда как показатели содержания СОД и МДА не отличались от таковых для здоровых лиц, что можно связать с адаптационными механизмами внутриклеточного метаболизма митохондрий лейкоцитов в ответ на развитие сердечно-сосудистого события. Таким образом, определение МПМ и содержания СДГ и ГР в лейкоцитах крови можно рассматривать как маркеры ранней диагностики развития митохондриальной дисфункции в результате сердечно-сосудистой катастрофы, а также как маркеры снижения первичной защитной функции клеток. Показатели СОД, которая является основным ферментом митохондрий, препятствующим накоплению активных радикалов кислорода, не имели значимых различий у пациентов с различными формами ОКС с индикаторами для здоровых лиц.

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА ДЛЯ АБСОЛЮТНОЙ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ УНИКАЛЬНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ РЕПЕРТУАРОВ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА С ПОМОЩЬЮ ЦИФРОВОЙ ПЦР

Слепцов А.А., Назаренко М.С.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук (НИИ МГ ТНИМЦ РАН), Томск, Россия.

Иммунитет является одним из ключевых компонентов здоровья человека. Адаптивная иммунная защита обусловлена, главным образом, разнообразием Т- и В-лимфоцитарных рецепторов, а восприятие и адаптация к внешним сигналам усиливает существующие рецепторы, а также способствует выработке новых, которые сохраняются как иммунологическая память. Основными участниками цитотоксических иммунных ответов являются Т-клетки, способствующие полной активации гуморального адаптивного ответа. Основную популяцию составляют $\alpha\beta$ Т-лимфоциты (95–99%), экспрессирующие альфа- и бета-цепи Т-клеточного рецептора (TCR), и, в меньшей степени, $\gamma\delta$ Т-клетки (1–5%).

Альфа-бета Т-клетки играют важную роль в клеточном иммунитете, поскольку они опосредуют распознавание антигенных пептидов в главном комплексе гистосовместимости I и II класса, определяя антигенные комплексы, патогены и неоантигены раковых клеток посредством TCR.

Т-клеточный рецептор представляет собой гетеродимерный белок плазматической мембраны и состоит из двух парных цепей, локусы которых организованы в виде семейств сегментных генов, включающих ген варибельности (V), ген разнообразия (D), соединительный (J) ген и константный (C) гены.

В процессе созревания Т-клеток в тимусе, у них происходит геномная рекомбинация VDJ-сегментов β - и δ -цепей и VJ сегмент α - и γ — цепей, которая сохраняется на протяжении всей жизни. При этом α - и β -цепи имеют три гиперварибельные комплементарно-определяющие об-

ласти (CDR1, CDR2, CDR3). Главным из которых является CDR3, обеспечивающий распознавание антигенов. Он кодируется сегментами VDJ или VJ.

Разнообразие репертуаров TCR существует за счет различных комбинаций VDJ и VJ. Чем выше уровень поликлональности Т-лимфоцитов, тем выше способность распознавать различные патогены. Однако появление олигоклонов, и в особенности моноклонов, свидетельствует не только о каком-то воспалительном процессе с присутствием специфического патогена, но и в целом о формировании онкологического заболевания, главным образом крови, таким как лейкоз. Для диагностики и терапии болезней важно владеть точной информацией о составе Т-лимфоцитов в крови, как в их качественном отношении, так и в количественном.

Целью настоящего исследования явилась разработка подхода к оценке Т-клеточного состава по образцам ДНК крови. Одной из главных задач явилось разработка методики определения и подсчета Т-клеточного репертуара с помощью цифровой полимеразной реакции.

Материалы и методы. В качестве тестовой ДНК послужила ДНК из биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики (г. Томск). Имеется персональное согласие пациентов, родителей или их законных представителей на проведение фундаментальных исследований. Проведение исследования одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

В качестве источника информации о V-, D-, J- сегментах гена *TCRB* использовалась база данных IMGT и инструмент IgBLAST. Разработка праймеров и проб выполнена с использованием таких программ как Primer3, OligoAnalyzer Tool, PrimerQuest. Пробы были синтезированы с двойным гасителем. Для VDJ локусов использовался флуорофор FAM. В качестве референса послужили регионы *TRAC* и *TRBC*, которые не участвуют в рекомбинации. Пробы для референса были помечены флуорофорой VIC.

Абсолютная квантификация проводилась с помощью реагентов для системы цифровой ПЦР QX200 Droplet Digital PCR System (BioRad), согласно протоколу производителя.

Основные результаты. Всего было синтезировано 121 праймеров, из них 82 прямых, 39 обратных праймеров, а также 98 зондов для локуса *TRB*, кроме того, по 4 варианта для референсных участков генов *TRAC* и *TRBC*. В результате проведенных экспериментов с использованием цифровой ПЦР было отобрано 37 прямых, 13 обратных праймеров и 31 зонд, обеспечивающих определение 40 функциональных V-сегментов (ген *TRBV*) и 13 J-сегментов (ген *TRBJ*) со стабильной воспроизводимостью и низким

шумом («эффект дождя»). Оптимальная температура для всех праймеров 62°C. Комбинация прямых и обратных зондов обеспечивает достаточный диапазон для определения практически всех вариантов репертуаров клонов T-лимфоцитов, без учета варибельности D-сегмента (ген *TRBD*) и гиперварибельности по регионам CDR1-3.

Заключение. Таким образом, нами был разработан набор праймеров и зондов для качественного и количественного определения T-клеточных репертуаров. В мультиплексном варианте данный набор позволяет определить олигоклональность T-клеточных репертуаров. Эта информация в особенности важна как для индивидов с ослабленным иммунитетом, так и пожилых лиц в целом, в том числе при подозрении на онкологическое заболевание. Несомненно, основным преимуществом данного набора является возможность динамического наблюдения ранее выявленного T-клеточного моноклона(-ов), не прибегая к дорогостоящим NGS-методикам.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-25-00745.

Конфликт интересов не заявляется.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ДОЗОЗАВИСИМЫМ ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Ачкасова М.А., Шкоденко Л.А.

Химико-биологический кластер Национального Исследовательского Университета ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Корректная идентификация возбудителя заболевания играет ключевую роль в назначении соответствующей терапии, что в последствии определяет динамику выздоровления пациента и распространения патогены среди популяции. Отдельную проблему в контексте данного вопроса представляет диагностика заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами. Трудность заключается в том, что условно-патогенные микроорганизмы обнаруживаются в образцах как больных, так и здоровых людей, из-за чего невозможно однозначно утвердить возбудителя только по факту его присутствия в организме. На сегодняшний день диагностика базируется на двух критериях — определении количества клеток предполагаемого патогена в образце больного, а также их пороговом числе, при котором микроорганизм возбуждает инфекцию. В лабораторных условиях такая диагностика осуществляется классическим методом ПЦР в реальном времени, а также микробиологическими высевами. Однако этот подход не мобилен, требует серьезного лабораторного оснащения, времени и обученного персонала, из-за чего достоверная диагностика в слаборазвитых и отдалённых населённых пунктах менее доступна и влечёт некорректность результатов и позднее начало терапии. Таким образом, решение вышеперечисленных проблем требует новых методов для обеспечения должной медицинской помощью всех слоёв населения.

Целью данного проекта является разработка простой тест-системы с дозозависимым определением инфекций, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, не требующей дорогостоящего обо-

рудования и специально оснащенных лабораторий.

Технология базируется на амплификации выбранных целевых фрагментов патогенов с помощью метода изотермической амплификации SPA (Stem-loop primer assisted isothermal amplification) с последующей детекцией продуктов амплификации ДНК-наносенсорами на основе G-квадруплекса. Определении количества ДНК микроорганизма в образце будет осуществляться путем сравнения уровня флуоресцентного сигнала детекции образца с калибровочной кривой, построенной на основе флуоресцентных сигналов детекции выбранного фрагмента ДНК тигра в точно известных количествах. Тигр был выбран как экзотическое животное, чья ДНК не встретится в больнице, то есть не попадёт в тест-систему с пробой. В ходе реализации проекта решаются следующие задачи с применением описанных методов:

- 1) Получение крови тигра из Ленинградского зоопарка, выделение ДНК набором «Биолабмикс» и очистка на магнитных частицах;
- 2) Накопление выбранной последовательности ДНК тигра при помощи классической ПЦР (дизайн праймеров в программе BLAST);
- 3) Получение культуры бактерий, трансформированных вектором pJET с выбранной последовательностью ДНК тигра (чтобы гарантировать постоянную доступность ДНК тигра в лаборатории);
- 4) Проведение серии SPA амплификаций ДНК тигра с работающими SPA-праймерами (дизайн праймеров в программе BLAST);

5) Конструирование ДНК-сенсоров на последовательность ДНК тигра в программах Unafold и NUPAC;

6) Построение калибровочной кривой на основе сигналов детекции ДНК-сенсорами продуктов амплификации SPA выбранного фрагмента ДНК тигра. Визуализация детекции производится в спектрофлуориметре Тесан;

7) Дизайн SPA-праймеров в программе BLAST и дизайн ДНК-сенсоров для последовательности гена бета-актина как контроля выделения и амплификации. Бета-актин был выбран в качестве контроля как один из самых распространенных белков в клетке человека.

В результате выполнения проекта успешно амплифицирован специфичный участок митохондрия тигра *Panthera tigris* isolate WEFCOM mitochondrion, который далее был амплифицирован повторно с более точной TERSUS полимеразой (вместо Taq), выделен из геля и клонирован в культуру *E. coli* K12 с помощью вектора pJET.

Также проведены предварительные эксперименты по дозозависимой детекции выбранного фрагмента ДНК тигра

для построения калибровочной кривой. Кроме того, подобраны и протестированы SPA-праймеры для гена бета-актина.

Разрабатываемая система контролей будет использоваться в тест-системе детекции пневмонии, в связи с чем выбраны целевые патогены, подобраны на них праймеры для изотермической SPA-амплификации и разработаны ДНК-наносенсоры для целевых патогенов в программах Unafold и NUPAC.

Максимальный потенциал проекта — разработка мобильного диагностического аппарата на основе представленной тест-системы. Эта технология позволит использовать описанный метод при создании устройств, не требующих долгих лабораторных процессов и обученного персонала, что сделает качественное здравоохранение более доступным в отдаленных городах и селах России, а также в малоразвитых странах.

Работа выполняется в рамках РФФ: «Разработка Point-of-Care диагностической системы на основе ДНК-наносенсоров для выявления инфекций респираторного тракта и их лекарственной устойчивости».

ОПОСРЕДОВАННАЯ ШПИЛЬКОЙ, НЕЗАВИСИМАЯ ОТ ПРАЙМЕРОВ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ (HAIR), КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕТОД ДНК-ДИАГНОСТИКИ

Набережнов Д.С.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, 119121, Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта, 119991, Москва, Россия;

Актуальность. В современной клинической лабораторной диагностике широко используются полимеразная цепная реакция. Тем не менее, несмотря на все свои преимущества у ПЦР есть недостатки, главным из которых является относительно длительное время, проходящее от момента взятия образца биоматериала у пациента до получения результата исследования, из которого время самой ПЦР составляет от одного до нескольких часов. Альтернативой полимеразная цепная реакция являются изотермические методы амплификации ДНК, особенностью, которых является то, что увеличение количества ДНК происходит при постоянной температуре, поэтому количество ДНК увеличивается непрерывно и время, требуемое на проведение амплификации ДНК, сокращается в разы. Во многом распространению этих методов способствовала эпидемия COVID-19, поскольку диагностика во время пандемии требует наиболее быстрых методов выявления патогена у пациента. Поэтому разработка новых методов изотермической амплификации ДНК представляется актуальной задачей, поскольку новые методы изотермической амплификации могут существенно упростить и сделать более доступными методы клинико-лабораторной диагностики.

Цель. Целью исследования было разработка нового метода изотермической амплификации — амплификация, опосредованная шпилькой (HAIR), позволяющего быстро и точно выявлять целевую последовательность ДНК в образце.

Методы. Механизм амплификации в методе HAIR основан на процессе самопроизвольного заворачивания

концевых последовательностей ДНК, содержащих палиндромные последовательности и похож на процесс репликации парвовирусов. Главной особенностью этого метода, отличающего его от других методов амплификации является то, что процесс амплификации протекает без использования праймеров. Праймеры требуются только для инициации реакции амплификации, затем реакция продолжается без их участия. Последовательность праймеров состоит из последовательности комплементарной целевой последовательности, последовательности связывания никазы Nt.BstNBI и последовательности палиндромных повторов. Кинетика реакции изучалась амплификацией в режиме реального времени, продукт амплификации HAIR появляется после 10 минут инкубации. Методом гель-электрофореза в агарозном геле изучались продукты реакции, которые представляют собой конкатемеры состоящий из более чем 500 мономеров и длиной более 50 тысяч пар оснований.

Выводы. Новый метод изотермической амплификации, представляет перспективный метод изотермической амплификации. Метод совместим с флуоресцентными ДНК-зондами, расщепляемыми никазой, поэтому продукт реакции может быть однозначно идентифицирован при помощи детекции, посредством флуоресценции, таким образом метод является с одной стороны экспрессным методом, а с другой стороны достоверным, что позволяет рассматривать эту реакцию, как перспективный метод клинической диагностики.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ БЕЛКИ ТОМ-КОМПЛЕКСА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ СТАРЕНИЯ И ГЕРОПРОТЕКТОРНОЙ ТЕРАПИИ

Зубарева А.С., Зубарева Т.С.

¹ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия

Митохондрии экспрессируют большое количество сигнальных молекул, которые принимают активное участие в регуляции таких биологически значимых процессов, как клеточное обновление, метаболизм, апоптоз, реализация эндогенных механизмов клеточного иммунитета. Важным критерием оценки деятельности митохондрий является состояние и потенциал наружной митохондриальной мембраны, основными белками которой являются белки TOM70 и TOM20 (ТОМ — транслоказа внешней мембраны митохондрий), участвующие в транспорте и обеспечивающие потенциал внутренней мембраны для выработки АТФ и импорт всех белков-предшественников митохондрий. Кроме того, экспрессия митохондриального белка TOM70 приводит к более сильному иммунному ответу, а также к активации других митохондриальных сигнальных белков, обеспечивающих защиту против инфекции. Транслоказа комплекса внешней мембраны митохондрий (ТОМ) функционирует как входные ворота большинства митохондриальных белков. Несмотря на то, что структура рецепторных субъединиц комплекса были описаны более 20 лет назад, только в настоящее время, с появлением молекулярных методов исследования высокого разрешения, появилась возможность детализации строения, межмолекулярного взаимодействия, а, соответственно, и понимания механизмов их функционирования.

Митохондрии участвуют в важнейших центральных метаболических путях и полностью интегрированы во внутриклеточные сигнальные сети, которые регулируют различные клеточные функции. Поэтому митохондриальные дефекты или дисрегуляция их функций играют ключевую роль в старении и в цитопатологических механизмах, лежащих в основе опухолевого роста, нейродегенеративных и других заболеваний.

Сигнальные молекулы нейроиммуноэндокринных взаимодействий являются интегральными маркерами межклеточных коммуникаций, что позволяет провести параллели в исследованиях на моделях экспериментальных животных и человека, значительно увеличив доказательный уровень гипотез старения человеческого организма. Молекулярный уровень исследований позволяет определить конкретные сигнальные молекулы, в частности механизмы митохондриального транспорта, которые могут являться и мишенями для разработки геропротекторов, и биомаркерами малоинвазивной диагностики и динамики процессов старения.

Цель работы: Определение уровней экспрессии белков митохондриального транспорта ТОМ-комплекса самок и самцов крыс при естественном старении *in vivo* и выяснения возможности использования этих белков как биомаркеров процесса старения и потенциальных мишеней для геропротекторной терапии.

Материалы и методы. Исследование проведено на 12 крысах линии Вистар, самок и самцов поровну, двух воз-

растных групп: молодые (4 мес) и старые (более 18 мес), с развившимся процессом инфламэйджинга, хронического иммунного воспаления, сопровождающего естественное старение организма. Для молекулярно-микроскопического анализа (общеморфологического и методом ИГХ) отобраны образцы печени и миокарда, как органов, клетки которых богаты митохондриями. Микрофотографии получены с использованием микроскопа Olympus IX73, обработка микрофотографий проводилась с помощью программы ImageJ.

Результаты. Морфологический анализ выявил в образцах печени старых животных в сравнении с молодой группой умеренные дисциркуляторные и дистрофические изменения гепатоцитов, с крупными ядрами гепатоцитов, лимфоцитарными инфильтратами в центральной зоне ацинуса, умеренным очаговым накоплением гликогена. Морфологическая картина миокарда также представлена типовыми изменениями миокарда, ассоциированными с возрастом.

Гепатоциты — клетки в меньшей степени подверженные прямому влиянию эстрогенов, поэтому достоверных различий между группами самок и самцов выявлено не было. В подгруппе молодых самцов показатели экспрессии TOM20 и TOM70 в ткани печени можно рассматривать как базовые уровни, что связано с отсутствием гормональных колебаний, оказывающих влияние на общие метаболические процессы. Они составляли $72,5 \pm 3,9$ и $67,4 \pm 1,6$ (%) соответственно, относительной площади экспрессии биомаркера к общей площади клеток в поле зрения. Экспрессия митохондриальных белков в печени молодых самок составила $68,5 \pm 1,7$ % для TOM20 и $62,1 \pm 3,8$ % для TOM70.

Показатели экспрессии митохондриальных маркеров в печени старых животных статистически достоверно отличались от установленных уровней в группе молодых животных. В группе старых самцов экспрессия составила $55,1 \pm 3,7$ для TOM20 и $61,5 \pm 0,5$ для TOM70, а в группе самок $62,3 \pm 2,6$ для TOM20 и $60,3 \pm 2,2$ для TOM70.

Уровень относительной экспрессии TOM20 в миокарде самцов составлял $61,6 \pm 7,6$ %, в миокарде самок — $74,4 \pm 2,3$ %. Уровень относительной экспрессии TOM70 в миокарде самцов составлял $65,1 \pm 1,8$ %, в миокарде самок — $71,6 \pm 3,8$ %.

Заключение. В группе старых животных отмечаются изменения общего метаболизма клеток со снижением синтеза мембранных митохондриальных белков, обеспечивающих стабильность данной органеллы. Более низкий уровень экспрессии TOM20 и TOM70 у самцов свидетельствует о снижении функциональной активности митохондрий вследствие замедления импорта белков-предшественников в митохондрии. Сниженный уровень белков семейства ТОМ в миокарде самцов, по сравнению с уровнем в миокарде самок, подтверждает данные литературы о различии характеристик митохондрий между полами.

Проведение дальнейших экспериментальных исследований с использованием фармакологических препаратов или физиологического воздействия геропротекторного, иммуномодулирующего, метаболического, противовирусного, кардио- или нейропротекторного

действия, позволит детализировать представления о механизмах взаимодействия внутриклеточных сигнальных молекул и определить перспективы использования белков митохондриальных мембран в качестве мишеней для геропротекторной или иммунной терапии.

СОЧЕТАНИЕ МЕТОДА К-БЛИЖАЙШИХ СОСЕДЕЙ И МЕТОДА ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ И СКРИНИНГА БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Р.В. Бутяев, Л.В. Плотникова, А.М. Поляничко

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Введение. Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) является одним из самых распространённых онкогематологических заболеваний. Одним из важных факторов успешной терапии таких патологий является их своевременная диагностика. Данная работа направлена на разработку скрининговых подходов с использованием инфракрасной (ИК) спектроскопии. Ранее нами была показана перспективность анализа ИК-спектра сыворотки крови для выявления множественной миеломы [1 -4], однако определить ХЛЛ таким способом до сих пор не удавалось.

Цель и задачи. Оценить эффективность метода анализа ИК-спектра сыворотки крови в комбинации с методами машинного обучения — методом главных компонент (МГК) и методом k-ближайших соседей (kNN — k Nearest Neighbours) для классификации образцов сыворотки крови с диагностированным ХЛЛ.

Материалы и методы. С помощью ИК-Фурье спектрометра Nicolet (ThermoFisher) были сняты спектры 8-ми образцов сыворотки крови больных ХЛЛ и 20-ти здоровых доноров. Измерения проводились в таблетках KBr в диапазоне (4000-800) см^{-1} с разрешением 2 см^{-1} и усреднением по 128 накоплениям.

Для анализа спектров на языке Python в целях реализации МГК был написан алгоритм NIPALS (нелинейный итеративный частичный метод наименьших квадратов), а также был использован алгоритм kNN (библиотека sklearn).

Основные результаты. ИК-спектр каждого образца был объединен в единую матрицу, 70% данных которой затем были использованы для обучения алгоритма (обучающий набор), а 30% использовали для проверки работоспособности алгоритма (проверочный набор). Обучение модели классификации на всём диапазоне (4000-650) см^{-1} не привело к необходимому результату, поэтому комбинация МГК и kNN применялась последовательно к каждому диапазону длины в 200 см^{-1} , начиная с 900 см^{-1} и с шагом в 200 см^{-1} . Осуществлялся поиск максимального значения макро-полноты (Macro Recall), то есть среднее значение доли правильно идентифицированных случаев по каждому из двух классов. Макро-полнота оценивалась по четырем применениям алгоритма на одном диапазоне с помощью кросс-валидации.

В результате поиска, было выбрано несколько подходящих соседних диапазонов в интервале от 3100 см^{-1} до 3700 см^{-1} , поэтому итоговое обучение модели происходи-

ло на этом интервале.

В обучающий набор было включено 14 образцов сыворотки крови доноров и 5 образцов сыворотки крови больных ХЛЛ. В проверочный набор включили 6 образцов доноров и 3 образца ХЛЛ. Результаты классификации образцов проверочного набора показаны в матрице ошибок.

Алгоритм верно классифицировал все проанализированные образцы здоровых доноров и больных ХЛЛ. Подобный результат, однако, мог быть вызван удачным выбором обучающего набора, поэтому дополнительно была проведена кросс-валидация с разделением исходного набора на четыре равные части и оценена макро-полнота, усредненная по четырём повторениям. Значение макро-полноты при кросс-валидации составило 0.85 — это значит, что с вероятностью в 85% новый образец будет классифицирован верно.

Выводы. Эффективность метода анализа ИК-спектра сыворотки крови больных в комбинации с методами МГК и kNN для классификации больных ХЛЛ была оценена с помощью метрики макро-полноты. Полученный результат позволяет судить о том, что и доноры, и больные ХЛЛ попадают в свою группу с вероятностью в 85%. Увеличить значение метрики полноты, а значит и улучшить качество классификации возможно с помощью увеличения обучающих и проверочных наборов за счёт получения новых образцов сыворотки крови здоровых доноров и больных ХЛЛ. В перспективе рассмотренный алгоритм может быть использован для создания системы скрининга ХЛЛ, что в свою очередь, вероятно, увеличит срок жизни пациентов с данным заболеванием.

Благодарности. Образцы сыворотки крови были любезно предоставлены Федеральным государственным бюджетным учреждением «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (г. Санкт-Петербург). Часть работ выполнена с использованием оборудования Научного парка СПбГУ (Оптические и лазерные методы исследования вещества, Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники, Криогенный отдел).

1. Mikhailets E.S. et al. Protein secondary structure analysis of serum from patients with oncohematological diseases // Journal of Physics Conference Series. 2021. V. 2103. No. 1. P. 012053.

2. Бутяев Р. В. и др. Применение метода главных ком-

понент для анализа ИК спектров сыворотки крови пациентов с онкогематологическими заболеваниями // АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ, Том 7, № 3, 2022, стр. 462-466.

3. Чернышев Д. А. и др. Особенности ИК спектров сы-

воротки крови больных множественной миеломой. // Оптика и спектроскопия. 2023. Т. 131, № 6, С. 805-809.

4. Тельная Е. А. и др. Инфракрасная спектроскопия сыворотки крови больных онкогематологическими заболеваниями // Биофизика. 2020. Т. 65. № 6. С. 1154-1160.

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-κB ПРИ ЕСТЕСТВЕННОМ СТАРЕНИИ, СОПРОВОЖДАЮЩИМСЯ ХРОНИЧЕСКИМ ВОСПАЛЕНИЕМ (ИНФЛАМЕЙДЖИНГОМ)

Белова Ю.И.¹, Зубарева Т.С.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии МЗ РФ, (СПб НИИФ), Санкт-Петербург, Россия

² АННО ВО НИЦ "Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии", Санкт-Петербург, Россия

Фактор транскрипции и регулятор иммунного ответа NFκB является ключевым связующим звеном научного интереса в области клеточной передачи сигналов, физиологически значимых особенностей и динамики ответов клеточной коммуникации, регуляции генов и механизмов обратной связи. Транскрипционный фактор NF-κB присутствует почти во всех типах клеток. В неактивном состоянии белки семейства NF-κB образуют комплексы с ингибиторами и локализуются в цитозоле. При действии различных активаторов происходит распад данных комплексов, а активированный транскрипционный фактор перемещается в ядро. Иницируемый различными сигнальными молекулами, NF-κB является заключительным звеном в процессе передачи клеточного сигнала. NF-κB был обнаружен и охарактеризован прежде всего как ключевой регулятор экспрессии индуцируемых генов в иммунной системе. Он играет важную роль в таких биологических процессах как иммунный ответ, воспаление, старение, онкогенез, апоптоз, пролиферация и дифференцировка клеток.

Сигнальная роль фактора транскрипции NF-κB имеет важное значение и в процессе старения, а его разнообразные функции связаны с основными признаками данного процесса, такими как: изменение межклеточной коммуникации, повреждение ДНК, возникновение окислительного стресса, воспаление. Инфламэйджинг — хроническое, необусловленное внешним патогенным раздражителем низкоуровневое воспаление, вносящее свой вклад в патогенез возрастных заболеваний, таких как аутоиммунные заболевания, сахарный диабет 2 типа, ожирение, атеросклероз и онкология. Гиперактивация NF-κB во многих типах клетки усиленная передача клеточных сигналов, наблюдаемые у пожилых людей, приводят к активации инфламмосомы NLRP3 и других провоспалительных путей, что в конечном итоге ведет к увеличению продукции IL-1β, TNF и IFN. Повышение концентраций данных провоспалительных цитокинов способствует непрерывной стимуляции иммунной системы и приводит к снижению рецепторной активности клетки, ослаблению взаимодействий между иммунными клетками. Среди субпопуляций иммунокомпетентных клеток особого внимания заслуживают лимфоциты, которые кроме непосредственного участия в

воспалительных реакциях адаптивного иммунного ответа способны синтезировать многочисленные сигнальные молекулы межклеточных взаимодействий.

Цель исследования: определить особенности экспрессии транскрипционного фактора NF-κB при естественном старении, сопровождающимся хроническим воспалением (инфламэйджингом).

Материалы и методы. Исследовали экспрессию NF-κB в лимфоцитах, полученных методом выделения на градиенте из периферической крови волонтеров разного возраста и пола: группа молодых (до 44 лет) и возрастных (среднего возраста до 60) и пожилого (до 75 лет). В группе возрастных волонтеров выделены подгруппы по наличию аутоиммунных, нейродегенеративных, онкологических заболеваний.

Визуализация иммуноцитохимического исследования выполнена с использованием реагентов на основе полимера и пероксидазы, результаты оценивали морфометрическим методом с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX73 и программного обеспечения cellSensStandart. Индекс экспрессии определяли как процентное отношение количества иммунопозитивных клеток к общему количеству клеток в поле зрения.

Результаты. Среднее значение экспрессии NF-κB в лимфоцитах в группе молодых волонтеров составила 52,4 %, в то время как уровень экспрессии в общей возрастной группе снижен в 6 раз и составляет 8,2%. Установлено, что достоверных отличий в экспрессии NF-κB в зависимости от пола в группах не выявлено. При сравнении результатов между подгруппами возрастных волонтеров с наличием указанных заболеваний также не обнаружено различий: среднее значение экспрессии у возрастных пациентов в подгруппе с аутоиммунными заболеваниями составило 8,3 %, в подгруппе с онкологическими заболеваниями — 6,3 % и в подгруппе с нейродегенеративными заболеваниями — 8,8 %. Таким образом, согласно полученным результатам, были выявлены достоверные отличия экспрессии транскрипционного фактора NF-κB между группами молодых возрастных волонтеров.

Заключение. Данное исследование свидетельствует о возможной информативной значимости NF-κB как инте-

грального диагностического маркера инфламейджинга, сопровождающего процесс старения организма и нарушения работы иммунной системы. Хроническое воспаление, вероятно, нарушает работу сигнальных путей иммунной системы, воздействуя на различные молекулы регуляции жизнедеятельности клеток, какой и является транскрипционный фактор NF-κB.

Молекулярный уровень исследований позволяет определить конкретные сигнальные молекулы, которые могут являться и мишенями для разработки геропротек-

торов, и биомаркерами малоинвазивной диагностики и динамике процессов старения. Продолжение исследования экспрессии транскрипционного фактора NF-κB тех же когортах параллельно на неиммунокомпетентных клетках тканей, доступных для малоинвазивной диагностики и скрининга, например, буккального эпителия, даст дополнительные сведения об изменениях в молекулярных механизмах процесса старения и межклеточной коммуникации, в которых задействована сигнальная система NF-κB.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ МИКРО РНК MIR-16, MIR-21, MIR-221 И MIR-222 ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ НОЖЕШТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Тимерман А.Д.¹, Столяр М.А.^{2,3}, Галанин В.В.⁴, Горбенко А.С.^{2,3}, Ольховик Т.И.⁵, Здзярская О.Л.⁴, Гаранджук А.И.⁴, Бахтина В.И.^{4,6}, Ольховский И.А.^{2,3}

¹ ФГАОУ ВО Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, Россия

² Красноярский филиал ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Красноярск, Россия

³ ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

⁴ КГБУЗ Красноярская краевая клиническая больница, Красноярск, Россия

⁵ КГБУЗ Межрайонная клиническая больница №7, Красноярск, Россия

⁶ ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск, Россия

Введение. МикроРНК представляют собой короткие не кодирующие белок молекулы, длиной от 18 до 24 нуклеотидов, регулирующие экспрессию генов путём РНК-интерференции. На сегодняшний день микроРНК являются перспективными биомаркерами различных патологических состояний в связи с их активным участием в регуляции широкого спектра функций клеток, а также относительной стабильностью в биологических образцах. Ранее было показано существенное изменение уровня отдельных микроРНК в плазме крови, костном мозге и биоптатах очагов поражения при множественной миеломе.

Цель настоящей работы заключалась в разработке наборов реактивов для количественного определения miR-16, miR-21, miR-221 и miR-222 и их апробация при тестировании образцов крови пациентов с множественной миеломой и группы контроля.

Материалы и методы. В исследование были включены анонимные образцы венозной крови 32 пациентов с множественной миеломой (17 мужчин (возраст от 41 до 77) и 15 женщин (возраст от 53 до 84)), в том числе 4 с первично выявленным заболеванием. Пациенты получали стандартную терапию по схемам VCD, PAD, Ixa-Rd, Elo-Rd, Dara-Rd, а также монотерапию даратумумабом, длительность терапии составляла от 7 до 3655 дней (Me=442). В качестве контрольной группы использовали образцы венозной крови 24 пациентов не имеющих онкологических заболеваний (11 мужчин (возраст от 27 до 85) и 13 женщин (возраст от 21 до 66)). Выделение микроРНК из лейкоцитов венозной крови выполняли наборами производства МИП

«Формула гена». Дизайн праймеров и зондов для реакций обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени осуществлялся с использованием базы данных miRBase и программы Primer3Plus. В реакции использовали полимеразы и буфер для обратной транскрипции компании ООО «Синтол» и ПЦР буфер МИП «Формула гена». Для внутреннего контроля качества проводимых исследований использовалась микроРНК miR-39. Статистическая обработка данных проводилась с использованием критерия Манна-Уитни в программах STATISTICA и RStudio.

Результаты. Разработанные диагностические тест-системы продемонстрировали удовлетворительные характеристики параметров эффективности ПЦР 103,5%; 96,7%; 96,5%; 97,3% и уровня аналитической чувствительности 3,5; 5,5; 4,5; 4,5 lg копий/мкл для miR-16, miR-21, miR-221 и miR-222 соответственно. При исследовании образцов крови было выявлено статистически значимое увеличение уровня лейкоцитарной miR-16 и miR-222 у первичных пациентов по сравнению с контрольной группой ($p < 0,0001$) и снижение данного маркера в процессе терапии, что соответствует данным об их изменении в CD138+ плазматических клетках пациентов с миеломой. Уровни miR-21 и miR-221 значимо не отличались в лейкоцитах у первично выявленных пациентов, однако были повышены на фоне специфической терапии ($p < 0,0001$).

Заключение. Разработанные диагностические тест системы для выявления miR-16, miR-21, miR-221 и miR-222 могут быть полезны для диагностики и исследования особенностей патогенеза множественной миеломы.

Раздел 26. SARS-CoV-2

ИДИОПАТИЧЕСКИЙ ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ И COVID-19-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ: РОЛЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В МОЛЕКУЛЯРНОМ ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Зулкарнеев Ш.Р.¹, Корытина Г.Ф.^{1,2}, Маркелов В.А.^{1,2}, Гибадуллин И.А.¹, Зулкарнеев Р.Х.¹, Авзалетдинов А.М.¹, Загидуллин Н.Ш.¹

¹ Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия;

² Институт биохимии и генетики— обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия.

Актуальность. Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) является интерстициальным заболеванием легких с неизвестной причиной и неясным патогенезом, быстро прогрессирующим и не имеющего эффективного лечения. Одним из самых грозных осложнений после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 является легочный фиброз. Механизмы которые запускают легочный фиброз и приводят к его быстрому прогрессированию остаются в значительной степени неопределенными. В течение последнего десятилетия значительно изменились представления о патогенезе ИЛФ, считается, что этиопатогенез и прогрессирование ИЛФ тесно связаны с постоянным повреждением эпителиа и дисфункцией между эпителиальными и мезенхимальными клетками после активации фибробластов. Имеются данные о вкладе иммунных и генетических факторов в развитие данного заболевания. Среди последних на сегодняшний день активно изучается роль длинных некодирующих РНК (днРНК). Они представляют собой одноцепочечные РНК длиной более 200 пар оснований, осуществляющих регуляцию экспрессии генов, транскрипции, трансляции, созревания белков и многие другие функции, в том числе благодаря связыванию и ингибированию микроРНК (миРНК), которые, в свою очередь, ингибируют мРНК.

Целью исследования является анализ экспрессионного профиля длинных некодирующих РНК, вовлеченных регуляцию процесса активации фибробластов легких, трансдифференцировку и старение эпителиальных клеток (H19, MALAT1, MEG3, DNМ3OS, TP53TG1, LINC00342) в легочной ткани и мононуклеарных клетках крови (PBMC) больных с ИЛФ и COVID-19 индуцированным легочным фиброзом.

Материалы и методы исследования. В рамках исследования нами осматриван 251 пациент с легочными патологиями. Для комплексного клинико-генетического исследования были сформированы следующие группы: 1 — пациенты с подтвержденным диагнозом идиопатический легочный фиброз (N=10); 2 — пациенты с диагнозом легочный фиброз после перенесенного 6-12 месяцев назад COVID-19 (N=16); 3 — контрольная группа (N=59). Диагноз ИЛФ устанавливался с учетом критериев диагностики согласно Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению ИЛФ. У всех участников исследования были собраны образцы цельной венозной крови и образцы легочной ткани,

полученной после проведения трансторакальной или транстрахеальной биопсии легочной ткани, дополненной, при отсутствии противопоказаний, видеоторакоскопической биопсией легкого. Получен биоптат легочной ткани минимальными размерами 3*3 мм и зафиксирован в растворе «Фиксатор IntactRNA» для стабилизации РНК. Изоляция мононуклеарных клеток (моноцитов и лимфоцитов, PBMC) из цельной крови проводилась в градиенте плотности фикола. Тотальная РНК была выделена из PBMC периферической крови и образцов тканей с использованием реактива и протокола «ExtractRNA», Евроген, Россия (www.evrogen.ru), согласно протоколу производителя.

С использованием геномных баз данных StarBase, RegulomeDB, Diana, miRDB, TargetScan NONCODE, lncRNADisease и на основании анализа сигнальных путей и клеточных функций с использованием базы KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes genes ontology) проведен предварительный биоинформационный анализ *in silico* для идентификации сети взаимодействующих мРНК, миРНК, lncRNA вовлеченных в ключевые сигнальные каскады, связанные с развитием легочного фиброза: активацию фибробластов легких, трансдифференцировку и старение эпителиальных клеток. По результатам поиска для анализа в были выбраны следующие гены длинных некодирующих РНК: TP53TG1 (ID: 11257) (TP53 target 1), LINC00342 (ID: 150759) (long intergenic non-protein coding RNA 342), H19 (ID: 283120) (H19 imprinted maternally expressed transcript), MALAT1 (ID: 378938) (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1), DNМ3OS (ID: 100628315) (DNМ3 opposite strand/antisense RNA), MEG3 (ID: 55384) (maternally expressed 3). Качество и количество матрицы РНК определяли на спектрофотометре «NanoDrop 1000». Синтез кДНК проведен с использованием набора реактивов «MMLV RT kit» (ООО Евроген, Россия). Исследование уровня экспрессии проведено на приборе StepOnePlus (AB, США). Относительный уровень экспрессии оценивали с помощью ddCt метода, в каждую реакцию включая отрицательный контроль. В качестве референса использовали ген домашнего хозяйства B2M. Различия в уровне относительной экспрессии между группой больных и контроля рассчитывали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (U-test) с использованием программного обеспечения MedCalc.

Результаты исследования. В группе больных ИЛФ в клетках легочной ткани было выявлено статистически значимое снижение экспрессии гена DNМ3ОS в 2,28 раза (Fold change=0.44, Fold Regulation=-2.28, P=0.0258) и увеличение уровня экспрессии гена LINC00342 в 2,917 раза (Fold change=2.917, Fold Regulation=2.917, P=0.0365). У больных COVID-19-индуцированным легочным фиброзом отмечено увеличение уровня экспрессии генов LINC00342 в 2,077 раза (Fold change=2.077, P=0.49) и H19 в 2,723 раза (Fold change=2,723, P=0.58), однако различия не достигли уровня статистической значимости. Для генов MALAT1, MEG3, TP53TG1 уровень экспрессии у больных был сопоставим с таковым в контрольной группе. В клетках PBMC группы больных с ИЛФ было выявлено значимое снижение уровня экспрессии генов MEG3 (Fold change=0.09, Fold Regulation=-10.569, P=0.0254). У больных COVID-19-индуцированным легочным фиброзом было выявлено статистически значимое снижение экспрессии генов TP53TG1 (Fold change=0.189, Fold Regulation=-5.27, P=0.017) LINC00342 (Fold change=0.27, Fold Regulation=-3.74, P=0.0346) MALAT1 (Fold

change=0.22, Fold Regulation=-4.532, P=0.047) и DNМ3ОS (Fold change=0.405, Fold Regulation=-2.463, P=0.0203).

Выводы. Нами были впервые получены данные об уровне экспрессии генов днРНК H19, MALAT1, MEG3, DNМ3ОS, TP53TG1, LINC00342 в группах больных ИЛФ и COVID-19-индуцированным фиброзом в различных тканях. Установлено, что профиль экспрессии днРНК у больных с легочным фиброзом различной этиологии отличается в различных типах тканей. В результате исследования установлено значимое изменение уровня экспрессии генов MALAT1, MEG3, DNМ3ОS, TP53TG1, LINC00342 при ИЛФ и COVID-19-индуцированном фиброзе легких. Данные днРНК являются мультифункциональными и могут выступать в качестве индуктора ремоделирования легочной ткани при легочном фиброзе посредством различных механизмов. Исследование молекулярных механизмов развития фиброза легких позволит усовершенствовать методики диагностики и терапии заболевания.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00019.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ACE И ACE2 НА ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ COVID-19. МЕТААНАЛИЗ

Гореленко М.В., Аль-Джавади А.М.А., Алсет Д.М., Ид М., Покудина И.О.

ФГАОУ ВО "Южный федеральный университет", Ростов-на-Дону, Россия

Актуальность. С конца 2019, вызванная SARS-CoV-2 пандемия, является острой проблемой для здравоохранения во всем мире и даже после отмены 5 мая 2023 года ВОЗ глобальной чрезвычайной ситуации, ситуация с данным заболеванием все еще остается кризисной с серьезными неблагоприятными последствиями. Несмотря на то, что все люди уязвимы к воздействию вируса SARS-CoV-2, тяжесть и исход заболевания отличаются и зависят от взаимодействия между вирусом и пораженным организмом-хозяином. Установлено, что SARS-CoV-2 использует белок ACE2 для проникновения в клетку, который, наряду с белком ACE, является регулятором ренин-альдостерон-ангиотензиновой системы. Актуальные данные, показывают, что ренин-ангиотензин-альдостероновая система ассоциирована с патогенезом SARS-CoV-2, нарушение баланса системы может привести к тяжелым последствиям в организме.

Целью исследования было изучение наличия ассоциаций между полиморфными вариантами rs4646994 (Alu Ins/Del) гена ACE и rs2285666 (G8790A) гена ACE2 с тяжестью течения COVID-19

Методы. Систематический поиск исследований ассоциации значимых полиморфизмов генов ACE и ACE2 и тяжестью течения COVID-19 был проведен в базах данных PubMed, Web of Science, Google Scholar, Science Direct, eLibrary, опубликованных до мая 2023 года. Статьи были проанализированы по протоколу PRISMA. Поиск статей проводили по ключевым словам: коронавирус, COVID-19, 2019-nCoV, SARS-CoV-2, ACE2, ACE1, полиморфизм, SNP. Критериями для включения исследований в метаанализ

были: дизайн случай-контроль; исследования ассоциации изучаемых полиморфизмов и тяжестью течения COVID-19 у людей; исследования, предоставляющие данные, относящиеся к распределению генотипов в контексте тяжести COVID-19, достаточные для расчета отношения шансов (OR) и 95% доверительного интервала (CI). Мета-анализ был проведен в программе RevMan 5.4. в доминантной, рецессивной и аллельной моделях. Степень гетерогенности исследований измерялась при помощи Q-теста в RevMan, гетерогенность считали значительной, если P<0,05 и/или I²>40%. Риск публикационного смещения оценивался путем построения воронкообразной диаграммы рассеяния.

Результаты. Из 564 проанализированных полнотекстовых статей, для мета-анализа были отобраны 18, по полиморфизму rs4646994 гена ACE в исследование включили 15 статей, по rs2285666 гена ACE2 – 10, которые подходили по всем критериям отбора. Большинство статей совмещали в себе исследования по двум изучаемым нами полиморфизмам. Для полиморфизма гена ACE в анализ включены данные генотипирования 2884 человек, численность группы с легким течением COVID-19 составила 1368 человек и 1516 человек с тяжелым течением заболевания. Мета-анализ полиморфизма гена ACE2 включает данные генотипирования 1530 человек, 663 и 867 человека с легким и тяжелым течением соответственно

Согласно результатам данного исследования, полиморфизм rs4646994 гена ACE ассоциирован с меньшей тяжестью COVID-19 в рецессивной (OR=0,73; 95% CI 0,60-0,89; p=0,002) и аллельной (OR=0,82; 95% CI 0,74-0,92; p=0,0009)

моделях, в доминантной модели значимый уровень достоверности не был достигнут ($OR=0,81$; 95% CI 0,63–1,03; $p=0,08$). В исследовании *ACE* гетерогенность отсутствовала в рецессивной модели ($p=0,002$, $I^2=0\%$), в доминантной была умеренной ($p=0,02$, $I^2=47\%$), в аллельной низкой: ($p=0,0009$, $I^2=14\%$). Значимая связь с риском тяжелой формы COVID-19 была установлена для рецессивной модели исследования полиморфизма rs2285666 гена *ACE2* ($OR = 1.84$; 95 % CI: 1,37– 2,49; $p<0,0001$). В доминантной и аллельной модели данного анализа не наблюдалось значимой ассоциации ($p=0,55$ и $p=0,06$ соответственно). Гетерогенность включенных исследований, касающихся *ACE2* (rs2285666) в связи с тяжестью COVID-19, была значитель-

ной в доминантной и аллельной моделях ($I^2=44\%$; $p=0,07$) и ($I^2=53\%$; $p=0,02$) соответственно, в рецессивной модели гетерогенность данных отсутствовала ($I^2=0\%$; $p=0,59$).

Выводы. Установленные значимые полиморфные варианты генов *ACE* и *ACE2* показывают, что генетические полиморфизмы хозяина могут влиять на клинические исходы инфекции SARS-CoV-2, изучение которых может помочь выявить тенденцию течения инфекции и степень тяжести заболевания, улучшить профилактику и/или лечение COVID-19.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности, проект № FENW-2023-0018

АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ *OMICRON* И *DELTA SARS-COV-2* СРЕДИ БОЛЬНЫХ, ПОСТУПАЮЩИХ В ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ СТАЦИОНАР

Шевякова Е.А., Зыкова Т.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Интенсивное развитие эпидемического процесса COVID-19 в глобальном масштабе создало благоприятные эволюционные условия для появления новых генетических вариантов возбудителя. Некоторые генетические изменения могут затрагивать такие свойства вируса, как, например, его способность к распространению, связанный с этим уровень контагиозности или эффективность вакцин, терапевтических препаратов, средств диагностики или иных медико-санитарных и социальных мер. К числу наиболее распространенных генетических вариантов *SARS-CoV-2*, вызывающих озабоченность (ВВО), относятся линии *B.1.617.1/B.1.617.2 (Delta)*, индийский, выявлен в апреле 2021 г.) и *B.1.1.529 (Omicron)*, выявлен в ноябре 2021 г.). На основании имеющихся данных о передаче, тяжести течения инфекции, повторном инфицировании, средствах диагностики и лечения, а также об эффективности вакцин были опубликованы рекомендации ВОЗ о необходимости дальнейшего ведения органами общественного здравоохранения мониторинга *BA.2* в качестве отдельной сублинии геноварианта *Omicron*. В рамках мониторинга варианта *Omicron* ВОЗ намерена продолжить тщательно отслеживать линию *BA.2* и просит страны сохранять бдительность, отслеживать и представлять генетические последовательности, а также проводить независимый сопоставительный анализ различных сублиний варианта *Omicron*.

Целью исследования стал анализ циркуляции указанных генетических вариантов среди больных, поступающих на лечение в онкологический стационар.

Материал и методы. В период с февраля по август 2022 г. было исследовано 175 образцов назофарингеальных мазков от пациентов, направленных на госпитализацию в ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ и прошедших положительно в скрининговом тесте на наличие РНК SARS-CoV-2. Все пациенты на момент обследования не имели клинических проявлений респираторных инфекций.

В исследование включали только образцы с $St<35$. Для выделения РНК использовали наборы «Проба-НК» (ООО «ДНК-Технология ТС»), выявление РНК — «SARS-CoV-2/SARS-CoV» (ООО «ДНК-Технология ТС»), для определения генетических вариантов методом ПЦР-РВ — «АмплиТест® SARS-CoV-2 VOC v.3» (ФГБУ ЦСП ФМБА России).

Результаты. Из общего числа образцов в 31 было определено недостаточное количество РНК (из них 6 в скрининговом тесте были с $St<30$, 25 — с St от 30 до 35). Остальные 144 образца были расценены как валидные.

Динамика выявления различных генетических линий была крайне стремительной. В феврале в 100,0% случаев (2/2) обнаруживался *Omicron BA.1* (мутации P681H+N679K+del69-70+A67V), в марте — только у 62,1% (41/66), а у 36,4% (24/66) начал выявляться *Omicron BA.2* (только мутации P681H+N679K). У 1,5% (1/66) был выявлен вариант только с мутацией P681R *Delta-2*, не позволяющей точно установить генотип вируса. В апреле уже преобладал *BA.2*– 70,6% (12/17), *BA.1* был у 29,4% (5/17). С мая по июль у 100,0% выявлялся *BA.2*, а в августе появился и в короткие сроки достиг значительного преобладания вариант с сочетанием мутаций, характерных для *Omicron* и *Delta* (мутации P681H+N679K+del69-70 и A67V+L452R) — 87,9% (29/33). Также снова появился *BA.1*– 9,1% (3/33), а на долю *BA.2* пришлось 3,0% (1/33).

Всего за исследуемый период на долю линии *Omicron* пришлось 114 образцов (79,2%), из них 51 (35,4%) был с линией *BA.1*, у 63 (43,8%) — вариант *BA.2*; у 29 (20,1%) — наличие маркеров *Omicron* и *Delta*, и в одном образце (0,7%) генотип вируса не был установлен.

Заключение. Полученные данные отражают динамику циркуляции геновариантов SARS-CoV-2 и могут быть полезными для понимания особенностей протекания инфекции, вызванной различными его штаммами.

ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМНОГО И МУКОЗАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ПОСТКОВИДНОМ СИНДРОМЕ, АССОЦИИРОВАННОМ С РЕКУРРЕНТНЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Агафонова Е.В.^{1,3}, Решетникова И.Д.^{1,2}, Петрова Д.Н.¹

¹ ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора,

² ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет,

³ ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет»

Последствия новой инфекции, при которой вирус SARS-CoV-2 вызывает мультиорганные поражения и дестабилизирует сопутствующую патологию-важнейшая проблема современного здравоохранения. Заражение SARS-CoV-2 индуцирует реакции системного и мукозального иммунитета (МИ)- повреждение, деструкцию и апоптоз иммунокомпетентных клеток, дисбаланс противо- и провоспалительных цитокинов и других маркеров, отражающих повреждение тканей. Данные нарушения могут длительно сохраняться на уровне системного и МИ, вызывая ВИД и транзиторные иммунные дисфункции. Серьезным последствием постковидной иммуносупрессии является формирование иммунопатологических синдромов (ИПС), связанных с повышенной чувствительностью к вирусным и бактериальным агентам, в частности, у реконвалесцентов (Р) COVID-19 часто формируется повышенная заболеваемость рекуррентными респираторными инфекциями (РПИ). Комплексная оценка системного и МИ у Р COVID-19 позволит оптимизировать дифференцированные рекомендации по иммунореабилитации при ИПС, ассоциированных с повышенной чувствительностью к инфекционным агентам. Цель исследования — комплексная оценка показателей системного и МИ у Р COVID 19 при реализации инфекционного синдрома, ассоциированного с РПИ.

Материалы и методы. Проводилась оценка иммунитета в группе медицинских работников- Р COVID 19 (n=19), у которых манифестировал инфекционный синдром, проявляющийся РПИ с частотой эпизодов ОРВИ по Me-8,4 [6-12] (в норме не более 2-4 эпизодов в год у взрослых). В 22,5 % диагностирован повторный COVID 19. Иммунофенотипирование лимфоцитов (л) и моноцитов (м) проводилось с использованием ПЦФ (FACSCalibur; Becton Dickinson; MultiSET) Оценивались основные CD3+CD19-(Т-л), CD3+CD4+(Т-х), CD3+CD8+(CTL), CD3-CD19+(В-л), CD3-CD16/56+(NK) и минорные субпопуляции л-CD3+CD16/56+(NKT), CD4+CD25+Hi (Т-рег.), CD5+CD19-(B2), CD5+CD19+ (B1), CD3-CD8+, CD3-CD4-CD8-(двойные негативные-DN), CD4+CD8+(двойные позитивные-DP), CD4+CD62L+,CD4+CD62L- и м-CD14++CD16+ (провоспалительные/супрессорные), CD14+16-(классические); экспрессия маркеров активации на Т-л и м-CD3+HLADR+, CD8+HLADR+,CD14+HLADR+. Комплексное исследование МИ включало клеточную составляющую в популяциях- нейтрофилы (N) и эпителиальные клетки (Э). Учитывались деструктивные (N деструктурированные-Nд; Э деструктурированные-Эд) и апоптотические изменения (N с признаками апоптоза-На, Э с признаками апоптоза Эа), фагоцитарная активность (ФИА-фагоцитарный индекс с аутофлорой; ФИС- фагоцитарный индекс со Sh. aureus),

способность к киллингу патогенов (ИП-интегральный показатель переваривания), внутриклеточная биоцидность (НСТ спонтанный; НСТ стимулированный). При изучении популяции Э оценивалось соотношение: плоский (ПЭ); кубический (КЭ); цилиндрический (ЦЭ); мерцательный (МЭ) Э, вакуольная дистрофия (ВДЭ) и метаплазии цитоплазмы (МЦЭ). Оценка секреторного компонента включая цитокиновый профиль (ФНО-α, IL-1, IL-10, IFN-γ, TNF α), мембранный маркер апоптоза — sCD95 (sAPO-1/FAS; пг/мл). В контроле обследованы лица (условно здоровые доноры) не имеющие хронических заболеваний и, по данным клинического и лабораторного обследования, не имеющие симптомов и маркеров COVID 19 (n=16).

Результаты. У Р COVID 19 достоверные различия получены для основных (Т-х, CTL, В, ЕКК) и малых субпопуляций л (NKT, Т-рег., B2, B1, CD3-CD8+, DP, DN, CD4+CD62L+,CD4+CD62L-). Регистрировалось снижение абсолютных значений Т-х ($0,63 \times 10^9/\text{л}$; $p < 0,05$), относительных и абсолютных значений В л (9,0 %; $0,16 \times 10^9/\text{л}$; $p < 0,05$, $p < 0,05$), перераспределение субпопуляций В1/B2 в сторону повышения субпопуляции В1- важнейшего продуцента аутоантител. У реконвалесцентов COVID 19 отмечалась повышенная экспрессия маркеров активации-ранней (CD4+25+13,5%; $p < 0,05$) и поздней (CD3+HLADR-16,78%; $p < 0,001$); CD8+HLADR+-23,2%; $p < 0,05$). Регистрировалось повышение субпопуляций с регуляторной/супрессорной активностью- NKT-12,9% ($p < 0,05$); DN-10,8% ($p < 0,05$), DP-5,8 % ($p < 0,05$), Т рег.-8,6 ($p < 0,05$). Субпопуляции NKT, CD4+CD25+Hi — важнейшие регуляторы иммунного ответа. NKT активируют созревание м и продуцируют цитокины, модулирующие активность CD4+л. Популяция CD4+CD25+Hi продуцируется тимусом как функционально зрелая и осуществляет супрессорную функцию при выраженной антигенной стимуляции, что определяется усилением антигенной нагрузки связанной с повышенной заболеваемостью ОРВИ (Shou G et al. 2022). Регистрировался более высокий уровень активированных/супрессорных м- CD14++CD16++5,6% ($p < 0,05$), CD14+HLADR+-10,8% ($p < 0,05$). Система МИ- основной плацдарм для внедрения и репликации SARS-CoV-2, подвергается массивному цитопатогенному воздействию. Изменения в популяции N у Р COVID 19 характеризуются усилением деструктивных-(Nд-15,4%; $p < 0,05$) и апоптотических процессов (На-6,5%; $p < 0,05$). Функциональные нарушения характеризуются депрессией фагоцитоза (ФИА-14,7 %, $p < 0,05$; ФИС-22,7 %, $p < 0,05$). В назальный секрет эвакуируются функционально неполноценные N, характеризующиеся выраженным угнетением кислородзависимой биоцидности (НСТ ст. -33,9%, $p < 0,05$), что способствует эскалации вирусных и бактериальных агентов. Отмечалось увеличение

уровня sAPO-1/FAS)-79,6 пг/мл ($p < 0,05$). Повышенное содержание про/противовоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-10) отрицательно регулирует содержание ИФН γ , который влияет на формирование функциональной неполноценности N. Изучение Э в группе контроля, а также длительные исследования данных параметров в нашей клинике показали, что Э МИ находятся в определенных и стабильных соотношениях: ПЭ;КЭ;ЦЭ;МЭ-72,5 \pm 9,2/9,5 \pm 2,2/8,9 \pm 2,4/9,12,2 \pm 2,4. При РПИ у реконвалесцентов COVID-19 отмечено изменение соотношений — снижение МЭ и нарастание ПЭ-89,5 \pm 7,9/9,5 \pm 2,1/8,9 \pm 1,9/2,1 \pm 0,9. Регистрировался более высокий уровень деструкции Э (Эд увеличивался в 1,8 раза).

Также у Р отмечалось усиление вакуольной дистрофии (ВДЭ) увеличивался в 1,9 раза) и метаплазии цитоплазмы (МЦЭ) увеличивался в 1,5 раза) Э. Данные нарушения регистрировались преимущественно в популяциях МЭ и ПЭ.

Закключение. Полученные результаты позволяют констатировать структурные и функциональные нарушения на уровне эпителиального барьера МИ у Р, что приводит к снижению цилиарного клиренса и формирует ВИД с повышенной заболеваемостью РПИ. В широком масштабе данные нарушения могут иметь решающее значение для изменения контроля вирусной нагрузки, а также опухолей и аутоиммунных процессов у Р COVID-19.

ОСОБЕННОСТИ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА IL-6 C-174G У ДЕТЕЙ С COVID-19

Агеева Е.С.¹, Аблаева Р.Н.¹, Рымаренко Н.В.¹, Дядюра Е.Н.²

¹ ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского» (КФУ им. В.И. Вернадского), Симферополь, Россия

² ГБУЗ РК «Республиканская детская инфекционная клиническая больница» (РДКБ), Симферополь, Россия

Актуальность. Цитокины вырабатываются различными клетками иммунной системы и выполняют ряд иммунных и воспалительных функций. Эффекты цитокинов зависят от ряда таких факторов, как их локальные концентрации, паттерны экспрессии рецепторов и интеграция множественных сигнальных путей в ответ на активацию иммунных клеток. IL-6 вызывает врожденный гиперовоспалительный ответ при SARS-CoV-1. В ряде исследований показано, что уровень IL-6 коррелирует с тяжестью заболевания новой коронавирусной инфекции (НКИ). При этом указывается что генетические факторы, участвующие в механизме регуляции иммунитета, показали связь между вариантом IL-6 C-174G и тяжестью SARS-CoV-2. А именно генотип CC полиморфизма C-174G гена IL-6 может играть важную роль в определении тяжести НКИ. В других исследованиях показано, что вариант CG полиморфизма C-174G IL-6 ассоциирован с более высокой концентрацией цитокина.

Целью исследования был анализ частоты встречаемости полиморфных генов IL-6 C-174G у детей с COVID-19.

Методы. Всего было обследовано 70 детей (в возрасте от 0 до 14 лет) с НКИ средней и тяжелой степени тяжести, поступившие в отделение ГБУЗ РК «Республиканская детская инфекционная клиническая больница» (г. Симферополь). Критериями включения в исследование были: перенесенная новая коронавирусная инфекция. Подписанное информированное согласие на включение в исследование. Критериями исключения явились: наличие осложненных форм перенесенных вирусных пневмоний при наличии выраженных функциональных легочных и внелегочных нарушений. Контрольную группу составили 148 доноров добровольцев. Верификация диагноза новая коронавирусная инфекция была основана на подтверждении вируса SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР и наличия клинически идентифицируемых симптомов или признаков инфекции верхних дыхательных путей, а именно зало-

женность глотки, боль в горле и лихорадка, и при рентгенологическом исследовании. Все пациенты подписывали информационное согласие на проведение исследования.

Для анализа полиморфизма C-174G гена IL6 кровь забирали из периферической вены. Выделение ДНК осуществлялось из цельной крови детей с новой коронавирусной инфекцией и здоровых добровольцев с помощью набора «ДНК-экспресс кровь» («Литех», Россия) согласно инструкции производителя. Постановка аллель-специфической ПЦР осуществлялась с помощью наборов «C-174G IL6» («Литех», Россия) согласно инструкции производителя. Детекция продуктов амплификации осуществлялась методом горизонтального электрофореза в 3-х % агарозном геле («Литех», Россия).

Исследование проводилось в ЦКП пользования научным оборудованием «Молекулярная биология» КФУ им. В. И. Вернадского.

Полученные данные анализировали в программном пакете Statistica 8.0. Для сравнения частот комбинаций аллелей использовался критерий χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность. Связь полиморфизмов с новой коронавирусной инфекцией анализировали путем определения критерия отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (95% ДИ), $p < 0,05$.

Результаты исследования. В результате исследования показано, что дикий аллель С был частым у детей с НКИ по сравнению с группой контроля— 54,5 % ($n=74$) и 43,4 % ($n=124$) соответственно. Во время как дикий аллель G более частым был в группе здоровых доноров— 56,6% ($n=162$) и 45,5 % ($n=62$).

Анализ аллельных комбинаций наиболее позволил установить, что наиболее часто встречающимся вариантом, как среди детей с НКИ, так и в группе контроля был гетерозиготный генотип CG полиморфизма C-174G гена IL6. При этом CG встречались статистически значимо чаще у детей с НКИ по сравнению с контрольной группой

(64,7 % (n=44) и 48,9 % (n=70) соответственно, $\chi^2 = 4,59$, $p < 0,05$, ОШ=1,933 (95% ДИ— 1,095-3,411)).

Вторым по частоте встречаемости был вариант СС— его частота составила 22,1 % (n=15) у детей с НКИ и 18,9 % (n=27) в группе контроля. В то время как частота гомозиготного генотипа GG была статистически значимо реже у детей с COVID-19 — 13,2 % (n=9) по сравнению с группой контроля—32,2 % (n=46), $\chi^2 = 9,29$, $p < 0,05$, ОШ=1,933 (95% ДИ — 1,095-3,411)).

Выводы. Установлено, что у детей гетерозиготный генотип CG полиморфизма C-174G гена IL6 ассоцииро-

ван с риском развития новой коронавирусной инфекции (анализ значения критерия отношения шансов ОШ=1,933 (95% ДИ— 1,095-3,411)). Генотип GG ассоциирован с проактивной функцией (ОШ=0,318 (95% ДИ 0,155-0,651)). Результаты подчеркивают важность генетических факторов как в восприимчивости к COVID-19, так и патогенезе заболевания НКИ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, программа «Приоритет-2030» № 075-15-2021-1323

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЁСШИХ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ

Куликова Д.Б., Носова В.О., Плотников А.А., Вечканов Е.М.

Академия Биологии и Биотехнологии (АБиБ), Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Церулоплазмин (ЦП) является $\alpha 2$ -глобулином плазмы крови, главной функцией которого является транспорт меди в организме. Также, обладая феррооксидазной активностью, ЦП катализирует окисление Fe^{2+} до Fe^{3+} . ЦП имеет молекулярную массу 132 кДа, впервые его кристаллическая структура была установлена в 1996 году. Белок составлен из 1046 аминокислотных остатков, гликозилирован тремя олигосахаридными цепями, связанными с аспарагином. ЦП состоит из шести доменов купредоксинового типа. Ионы меди следующим образом распределены в молекуле ЦП: три иона Cu^{2+} образуют трёхъядерный кластер на границе раздела доменов 1 и 6, остальные располагаются в доменах 2, 4, 6.

ЦП является белком острой фазы, его уровень в плазме/сыворотке крови повышается при инфекционных воспалительных заболеваниях. Немаловажную роль играет ЦП и в антиоксидантной защите, поскольку контролирует окисление мембранных липидов.

Имеется ряд патологий, для которых уровень ЦП является маркерным признаком. Так, избыток данного белка-фермента может свидетельствовать о лимфоме, ревматоидном артрите, раке лёгких, болезни Альцгеймера. Напротив, недостаток ЦП, вероятно, указывает на болезнь Вильсона, болезнь Менке, ацерулоплазминемиию.

Кроме вышеперечисленных патологический состояний, уровень ЦП может варьировать при беременности, приёме оральных контрацептивов, недостатке белка в принимаемой пище.

COVID-19 — инфекционное заболевание, возбудителем которого является коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2 (SARS-coV-2). Коронавирусы (CoV) являются представителями семейства Coronaviridae и имеют одноцепочечный РНК-геном. SARS-COV-2 заражает клетки легких путем связывания с рецепторами ACE2 хозяина, которые в избытке экспрессируются как в альвеолярных эпителиальных клетках типа II, так и в многоресничных эпителиальных клетках. ACE2 играет критическую роль в регуляции окислительно-восстановительного ба-

ланса; он катализирует превращение сосудосуживающего пептида ангиотензина II в сосудорасширяющий ангиотензин 1-7. Снижение экспрессии ACE2, наблюдаемое при инфекции SARS-CoV-2, должно обеспечить беспрепятственное связывание ангиотензина II с рецепторами AT1, что, в свою очередь, активирует НАДФН-оксидазу и увеличивает выработку активных форм кислорода.

Посткоронавирусный синдром описан в литературе как системное, постинфекционное, воспалительное состояние после заражения COVID-19. Он включает в себя ряд симптомов, таких как неврологические расстройства, бессонница, вегетативная дисфункция, нарушения обоняния и вкуса, кашель, выпадение волос, миалгия.

Как уже было сказано выше, ЦП выполняет антиоксидантные функции в биологических системах, уровень его повышается при инфекционных воспалительных заболеваниях, в том числе и у пациентов, имеющих COVID-19 или перенёсших его в различных степенях тяжести.

Цель и задачи. Целью данного исследования стало изучение взаимосвязи между наличием перенесённого коронавирусного заболевания и уровнем церулоплазмина в сыворотке крови, а также анализ влияния таких факторов, как пол, возраст и тяжесть перенесённого коронавирусного заболевания на уровень данного показателя.

Задачи:

1. Изучить литературные данные о церулоплазмине, колебаниях его уровня при различных заболеваниях, в том числе при COVID-19;

2. Изучить литературные данные об окислительном стрессе, сопровождающем протекание коронавирусной инфекции;

3. Сравнить уровень церулоплазмина в сыворотке пациентов, перенёсших коронавирусную инфекцию и условно здоровых людей-доноров.

Материалы и методы. В качестве биологического материала была использована гепаринизированная сыворотка переболевших людей. В ходе исследования было проанализировано 138 проб пациентов разного возраста,

пола и перенёсших заболевание в разной форме тяжести. Было сформировано три группы по усреднённым признакам: группа по усреднённому возрасту (учитывались тяжесть и пол), по усреднённой половой принадлежности (учитывались тяжесть и возраст), по усреднённой тяжести (учитывались пол и возраст)

Концентрация ЦП определялась модифицированным методом Равина. Метод основан на окислении пара-фенилендиамина при участии ЦП. По оптической плотности образовавшихся продуктов определяют концентрацию ЦП. Измерение оптической плотности проводилось на СФ при $\lambda=530$ нм.

Для обработки статистических данных использовался пакет программ «STATISTICA — 10.0» и «Microsoft Office Excel» на основе непараметрического критерия

Манна-Уитни, так как массив обрабатываемых данных не подчинялся нормальному распределению. Результаты были представлены в виде медианы и межквартильного размаха

Основные результаты. По результатам проведённого исследования было выявлено, что уровень церулоплазмينا во всех испытуемых группах был повышен по сравнению с контрольной группой в 5-6 раз. Сравнивая испытуемые группы между собой, значимых различий выявлено не было.

Выводы. На основании полученных результатов можно заключить, что уровень церулоплазмينا повышается при посткоронавирусном синдроме, причём повышение данного показателя не зависит от пола, возраста и тяжести перенесённого коронавирусного заболевания.

АССОЦИАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ *SOD1* И *SOD2* С ТЯЖЕСТЬЮ ТЕЧЕНИЯ COVID-19

Ид М., Шкурят Т.П.

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Кафедра генетики, Ростов-на-Дону, Россия

Введение и актуальность. Коронавирусная инфекция (COVID-19) — тяжёлая вирусная инфекция, вызываемая коронавирусом тяжёлого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2). По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (до 16го августа 2023 г.), зарегистрировано около 770 млн подтвержденных случаев COVID-19, в том числе более 6,9 млн случаев смерти [1].

Окислительный стресс представляет собой дисбаланс между производством свободных радикалов и способностью антиоксидантной системы их детоксифицировать. Роль редокс-статуса в патогенезе большинства заболеваний, в том числе вирусных инфекций, обусловила актуальность изучения вариаций в системе оксидант/антиоксидант на всех уровнях, включая генетические варианты генов, кодирующих антиоксидантные ферменты [2].

Цель и задачи. Изучение ассоциации полиморфизмов генов супероксиддисмутазы-1 (*SOD1*), и супероксиддисмутазы-2 (*SOD2*), которые являются ферментами с антиоксидантной активностью, с тяжестью течения COVID-19.

Материалы и методы. Проведено генотипирование образцов ДНК 90 человек обоего пола (45 легких случаев, 45 тяжелых случаев) методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Образцы крови были получены в медицинском центре «Наука» (Ростов-на-Дону). Исследование проводилось в посткоронавирусный период (не менее 2 месяцев после выздоровления). Критерии включения в исследование: инфекция SARS-CoV-2 в анамнезе, подтвержденная методом ПЦР, и наличие антител IgG к вирусу (при легком течении инфекции). Критерии исключения: отсутствие антител IgG к SARS-CoV-2. Исследуемые группы были классифицированы в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Геномную ДНК выделяли с использованием набора для выделения РНК/ДНК РИБО-преп (ФБУН ЦНИИ

эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Генотипирование SNPs проводили с использованием коммерческих наборов («Синтол», Россия) на приборе QuantStudio™5 Real-Time PCR («Thermo Fisher Scientific», США). Для сравнения изучаемых групп использовался t-критерий Стьюдента. Для оценки различий в распределении аллельных вариантов между изучаемыми группами использовали χ^2 -критерий, статистически значимым считали $p \leq 0,05$. Отношения шансов (ОШ), указанные с 95% доверительным интервалом (ДИ), были рассчитаны для оценки риска тяжелого течения COVID-19.

Основные результаты. Выявлена достоверная ассоциация полиморфизма *SOD2* C47T (rs4880) с тяжестью течения COVID-19 ($p=0.014$). Носители гомозиготного генотипа (ТТ) имеют более тяжелое течение COVID-19 (ОШ = 5.62; 95% ДИ = [1.44 — 21.97]). Не было обнаружено значимой связи между *SOD1* G7958A (rs4998557) и тяжестью течения COVID-19. Для подтверждения результатов необходимы дальнейшие исследования с большим размером выборки.

Заключение/выводы. Результаты могут служить новым дополнительным прогностическим фактором инфекции COVID-19.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № FENW-2023-0018.

Список литературы:

- 1)- <https://covid19.who.int/>. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 16 Aug 2023.
- 2)- Eid, M. A., Aleksandrova, A. A., Shkurat, M. A., & Shkurat, T. P. (2023). The association of PON1 and NOS3 genetic variants with the severity of COVID-19. *Gene Reports*, 33, 101814.

ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ С ТЯЖЕСТЬЮ ТЕЧЕНИЯ COVID-2019

Аль-Джавади А.М.А., Покудина И.О., Гутникова Л.В., Александрова А.А., Шкурят Т.П.

ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия

Актуальность. Иммунный ответ против SARS-CoV-2 начинается с активации рецепторов распознавания образов врожденного иммунитета, ключевую роль играют Toll-подобные рецепторы (TLRs) (Mahmoud M.A. et al., 2022). TLRs имеют важное значение в распознавании патоген-специфичных молекул, регуляции цитокиновой экспрессии, а также опосредованной активации адаптивного иммунитета. SARS-CoV-2 активирует врожденную иммунную систему через TLRs, что способствует элиминации вируса. Передача сигналов TLR может быть критической вовлечена в цитокиновый шторм инфекции SARS-CoV-2, привести к системному гипервоспалению и разрушению тканей (Debnath M. et al, 2020).

Целью исследования являлся анализ ассоциаций между полиморфизмами генов *TLR9* (rs57438360), *TLR4* (rs5743836), *TLR2* (rs5743708), *TLR3* (rs3775291) тяжестью течения COVID-19.

Материалы и методы. В исследование включены данные генотипирования ДНК 315 человек обоего пола в возрасте 22-75 лет с разной тяжестью течения COVID-19. Среди них: 118 пациентов с легким течением заболевания, 114 — средняя тяжесть течения, 83-тяжелое течение. Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили термокоагуляционным методом реагентами «ДНК-экспресс-кровь» (ООО НПФ «Литех», Россия). SNP детектировали методом аллель-специфической ПЦР с помощью реагентов «SNP-экспресс-ЭФ» (ООО НПФ «Литех», Россия) с последующей УФ-детекцией результатов в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Результаты. Анализ результатов, проведенного исследования, ассоциации полиморфизмов генов *TLR3*

(rs3775291), *TLR 4* (rs5743836) и *TLR 9* (rs57438360) с тяжестью течения COVID-19 не выявил. Для полиморфизма *TLR2* (rs5743708) статистически значимые различия были обнаружены в распределении аллелей ($\chi^2 = 6.322$; $p = 0.043$) и генотипов ($\chi^2 = 6.595$; $p = 0.0037$). Носительство доминантной гомозиготы Arg/Arg *TLR2* достоверно снижает риск тяжелой формы COVID-19 у пациентов со средней (OR=0.373; 95 % CI 0.14 -0.993, $p=0.042$) и легкой (OR=0.329; 95 % CI 0.118-0.916 $p=0.027$) степенью тяжести. Гетерозиготы Arg/Gln при тяжелом течении встречаются в 2.68 чаще, чем при легком и в 3.049 раза чаще, чем при среднем (95 % CI 1.007-7.131, $p=0.042$ и 95 % CI 1.092-8.477, $p= 0.027$ соответственно).

Выводы. Исследование показало, что полиморфизм гена *TLR2* (rs5743708) может иметь прогностическую значимость и являться возможным фактором риска тяжелого течения инфекции SARS-COV-2.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности, проект № FENW-2023-0018

Список литературы

1. Debnath M., Banerjee M., Berk M. Genetic gateways to COVID-19 infection: implications for risk, severity, and outcomes. *FASEB J.* 2020;34(7):8787–8795.

2. Mahmoud M Alseoudy, Mohamed Elgamal, Dalia A Abdelghany, Asmaa M Borg, Ahmed El-Mesery, Dina Elzeiny, Maha O Hammad. Prognostic impact of toll-like receptors gene polymorphism on outcome of COVID-19 pneumonia: A case-control study. *Clin Immunol* 2022 Feb;235:108929. doi: 10.1016/j.clim.2022.108929. Epub 2022 Jan 19.

РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТОВ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ К СПАЙКОВОМУ БЕЛКУ SARS-COV-2 НА ОСНОВЕ E.COLI

Арипов В.С.¹, Волкова Н.В.¹, Наякшин А.М.², Мечетина Л.В.², Чикаев Н.А.², Несмеянова В.С.¹, Исаева А.А.¹, Ильичев А.А.¹, Таранин А.В.², Щербатов Д.Н.¹

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

Введение: Однодоменные антитела (наноантитела, VNN) антигенсвязывающий фрагмент особых антител из крови животных семейства верблюдовых, полностью лишенных легких цепей. Наноантитела способны функционировать самостоятельно в отсутствие константных областей и легких цепей. По сравнению с переменными участками классических антител, однодоменные антитела конформационно стабильнее при различных

pH и температурных диапазонах. Благодаря своим маленьким размерам (около 15 кДа) они могут связываться с эпитопами антигена, недоступных классическим антителам. Это имеет значительную роль в поиске нейтрализующих антител против SARS-CoV-2, поскольку спайковый поверхностный белок этого вируса имеет большое количество гликозилированных участков, недоступных полноразмерным антителам. Распознавание антигенных

детерминант такого белка, однако возможно однодоменными антителами.

Цель работы: получить и охарактеризовать однодоменные антитела к спайковому белку SARS-CoV-2 в прокариотической системе.

Материалы и методы: была проведена иммунизация ламы рекомбинантным RBD (Receptor-Binding Domain) S-белка SARS-CoV-2 варианта B.1.1.7 (Alpha). Из сыворотки крови с помощью ПЦП были амплифицированы последовательности, кодирующие однодоменные антитела. Полученные нуклеотидные последовательности однодоменных антител были клонированы в фагмиду pHEN4, с последующей наработкой фаговой библиотеки. Биологический титр полученной иммунной библиотеки составил 1×10^{11} БОЕ/мл. После четырех раундов аффинной селекции с использованием рекомбинантных RBD из библиотеки отобраны 54 фаговых клон, экспонирующих однодоменные антитела. После анализа специфического взаимодействия однодоменных антител и секвенирования их нуклеотидных последовательностей отсеяны 42 фаговых клон, имею-

щих дефекты в нуклеотидной последовательности и не показавшие специфическое взаимодействие с рекомбинантными RBD. Нуклеотидные последовательности остальных 12 клонов были клонированы в составе экспрессионного вектора pET21a для получения прокариотических продуцентов однодоменных антител. Синтеза однодоменных антител достаточного для проведения иммунохимического анализа удалось достичь у 7 вариантов наноантител. Лизаты индуцированных продуцентов были проверены на ингибирование взаимодействия между рекомбинантным RBD (вариантов Alpha (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2), *Omicron* (B.1.1.529)) и ангиотензинпревращающим ферментом-2 (ACE2).

Результаты: выяснилось, что два однодоменных антитела блокируют взаимодействие ACE2 с RBD вариантов Alpha и Delta, четыре однодоменных антитела блокируют взаимодействие между ACE2 и RBD вариантов Alpha и *Omicron*. Однодоменные антитела, ингибировавшие взаимодействие у ACE2 с RBD варианта Delta, не ингибировали такое взаимодействие с RBD варианта *Omicron* (таблица 1).

ТАБЛИЦА 1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ С РЕКОМБИНАНТНЫМИ ТРИМЕРАМИ S-БЕЛКА SARS-COV-2 РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ

		B.1.1.7 (Alpha)	B.1.617.2 (Delta)	B.1.1.529 (Omicron)
ВНН	1/5	+	-	+
	1/6	+	-	+
	1/9	+	-	+
	1/10	+	+	-
	2/2	+	+	-
	2/8R4K1	-	-	-
	2/8R4K3	+	-	+

Заключение: таким образом, в результате проделанной работы получены 6 однодоменных антител, показавшие разные степени ингибирования взаимодействия между тремя вариантами RBD и ACE2. Сравнение полученных результатов с литературными данными говорит о

том, что антитела, ингибирующие взаимодействие между RBD и ACE2, потенциально могут быть нейтрализующими. В дальнейшем планируется изучение нейтрализующей активности полученных антител с нативным SARS-CoV-2 различных штаммов.

КОМБИНАЦИИ ГЕНОТИПОВ TLR9 T-1237C – IL6 G-174C У БОЛЬНЫХ COVID-19 РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

С. Э. Баландина¹, С. В. Беляева^{1,2}, Д. С. Сташкевич¹, Т. А. Суслова^{1,2}, А. А. Крохин²

¹ ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

² ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», Челябинск, Россия

Введение. Важную роль в распознавании вирусных частиц SARS-CoV-2 и активации врожденной иммунной системы играют Toll-подобные рецепторы (TLR). Эндосомальным рецептором, распознающим мотивы РНК и ДНК, богатые метилированными последовательностями яв-

ляется TLR9. И поскольку SARS-CoV-2 имеет CpG-мотивы в своем генетическом материале, вероятно, что вирус напрямую активирует TLR9 в эндотелиальных клетках (Bezemer G., Garssen J., 2021). Запуск путей активации TLR приводит к секреции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1,

IL-6 и TNF- α , а также IFN 1 типа (Khanmohammadi S. et al., 2021), плейотропное действие из которых оказывает IL-6, в результате чего IL-6 является одним из ключевых звеньев иммунного ответа.

Аллельный вариант TLR9(-1237)*C, вызывающий активацию провоспалительных хемокинов и цитокинов, а также адаптивных иммунологических реакций, связан с более высокой частотой COVID-19 (Alhabibi A.M. et al., 2023), что было выявлено нами ранее (Беляева С. В. и др., 2023) — аллель C чаще встречался в группе больных в сравнении с контрольной (19,421% и 11,275% соответственно, $p=0,019$). В то же время, патофизиологический процесс, лежащий в основе COVID-19, характеризуется усиленным иммунным ответом хозяина и повышенным уровнем циркулирующих провоспалительных цитокинов, включая IL-6 (Paces J. et al., 2020). Аллель TLR9 (-1237)*C связан с регуляторным сайтом IL-6, что ведет к увеличению экспрессии рецептора к SARS-CoV-2 при действии цитокина (Carvalho A. et al., 2011). TLR9 T-1237C вызывает усиление передачи сигналов комплекса TLR9/IL6, приводя к нарушению пролиферации В-клеток при воздействии метилированных мотивов CpG SARS-CoV-2, в результате чего снижается выработка антител к возбудителю в ответ на работу данного комплекса (Liu Z-M et al., 2022). Кроме того, IL-6 в значительной степени способствует нарушению регуляции иммунного ответа при COVID-19 и развитию цитокинового шторма, в результате его сверхэкспрессии.

В предыдущей работе (Беляева С. В., 2022) нами было выявлено, что у больных с тяжелой и средней формами COVID-19 преобладал аллель IL6 (-174)*G (56% и 55%), который отвечает за повышенную продукцию

цитокина, а у больных с легкой наоборот аллель IL6 (-174)*C (54%), который снижает продукцию IL-6. Исходя из имеющихся у нас данных по значению TLR9 и IL-6 при COVID-19 становится актуальным рассмотреть их совместный вклад в патогенез COVID-19. Поэтому целью нашего исследования явился поиск сочетаний генотипов межгенных комбинаций TLR9 T-1237C и IL6 G-174C у больных COVID-19 русских Челябинской области с различными видами пневмонии.

Материалы и методы. Исследуемую группу составили больные COVID-19 русские Челябинской области, поделенные на 2 группы. Первую группу составили больные с односторонней и долевого пневмонией (54 человека), вторую — с типичной двусторонней пневмонией (45 человек). Все пациенты, входящие в исследуемые нами группы, имели подтвержденную инфекцию COVID-19 и проходили на тот момент лечение в противокоронавирусных госпиталях города Челябинска. Определение SNP в гене TLR9 T-1237C и IL6 G-174C было проведено с помощью ПЦП с реактивами ООО НПФ «Литех» (г. Москва). Частота межгенной комбинации определялась путем вычисления количественного содержания определенной комбинации генотипов TLR9 T-1237C — IL6 G-174C внутри одной группы и для подсчетов выражалась в процентах. Достоверность оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона, критерия отношения шансов (OR) и соответствующих 95% доверительных интервалов (CI). Полученные результаты считали статистически достоверными при $p<0,05$.

Результаты. В нашем исследовании было определено 9 комбинаций генотипов TLR9 T-1237C и IL6 G-174C. Результаты представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. КОМБИНАЦИИ ГЕНОТИПОВ TLR9 T-1237C — IL6 G-174C У БОЛЬНЫХ COVID-19 РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ С РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ ПНЕВМОНИИ

Комбинация генотипов TLR9 T-1237C — IL6 G-174C	Группа 1 (n=54)	Группа 2 (n=45)	χ^2	p-Value	OR с 95% CI
	Частота межгенной комбинации (%)				
TLR9 (-1237)*C/C — IL6 (-174)*C/C	3,7	2,2	0	1	1,692 [0,148; 19,297]
TLR9 (-1237)*C/C — IL6 (-174)*G/C	7,4	4,4	0,037	0,848	1,720 [0,300; 9,855]
TLR9 (-1237)*C/C — IL6 (-174)*G/G	1,9	4,4	0,5895	$p>0,05$	0,406 [0,036; 4,626]
TLR9 (-1237)*T/C — IL6 (-174)*C/C	3,7	4,4	0	1	0,827 [0,112; 6,118]
TLR9 (-1237)*T/C — IL6 (-174)*G/C	9,3	9	0,082	0,774	1,046 [0,263; 4,152]
TLR9 (-1237)*T/C — IL6 (-174)*G/G	7,4	4,4	0,037	0,848	1,720 [0,300; 9,855]
TLR9 (-1237)*T/T — IL6 (-174)*C/C	11	20	1,509	0,22	0,500 [0,163; 1,532]
TLR9 (-1237)*T/T — IL6 (-174)*G/C	31,5	26,8	0,275	0,601	1,264 [0,526; 3,032]
TLR9 (-1237)*T/T — IL6 (-174)*G/G	24,1	24,4	0,002	0,966	0,980 [0,390; 2,466]

Заключение. В результате сравнительного анализа частот сочетаний генотипов TLR9 T-1237C и IL6 G-174C достоверные различия между группами больных с различными видами пневмонии при COVID-19 не были обнаружены. Однако, были определены следующие резуль-

таты. В обеих группах наиболее распространенной была комбинация генотипов TLR9 (-1237)*T/T — IL6 (-174)*G/C с частотой встречаемости 31,5% в 1 группе и 26,8% во 2 группе, $\chi^2=0,275$; $p=0,601$, OR=1,264 CI 0,526-3,032. По данным литературы аллель IL6 (-174)*G ассоциирован с

повышенной продукцией цитокина (Paces J. et al., 2020). Низкая частота встречаемости была характерна для дигомозигот по мутантному типу: 3,7% в 1 группе, против 2,2% во 2 группе, $\chi^2=0$; $p=1$, OR=1,692 CI 0,148-19,297. Согласно данным литературы гомозиготный генотип TLR9 (-1237)*C/C ассоциирован с повышенной транскрипционной активностью TLR9, что ведет к гиперпродукции ме-

диаторов воспаления (Alhabibi A.M. et al., 2023), вызывая развитие более тяжелых форм заболевания. В то время как аллель IL6 (-174)*C ассоциирован с пониженной экспрессией данного интерлейкина. С частотой 3,7% (менее распространенной) в 1 группе также встречался генотип TLR9 (-1237)*T/C — IL6 (-174)*C/C, $\chi^2=0$; $p=1$, OR=0,827 CI 0,112-6,118.

ПОЛУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К НУКЛЕОКАПСИДНОМУ БЕЛКУ ВИРУСА SARS CoV-2

Порываева В.А., Могильных А.К., Малыхина М.А., Агафонова О.А., Усикова Л.А., Некрасов Б.Г., Репникова Е.Г., Хвостова Е.П., Бабкина И.Н., Брежнева С.О., Вторушина И.А., Рукавишников М.Ю.

АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Введение. В 2020 году мировое сообщество столкнулось с пандемией COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2. Появление нового вируса, способного быстро распространяться в человеческой популяции и вызывать тяжёлые формы заболевания, сделало необходимым разработку различных методов диагностики COVID-19. Несмотря на более низкую чувствительность по сравнению с ПЦР, выявление вирусного антигена в клинических образцах в иммуноферментном анализе (ИФА) или в иммунохроматографическом тесте (ИХА) делают такие методы анализа востребованными в ряде случаев: при недоступности ПЦР, при необходимости быстро поставить диагноз. Чаще всего в наборах, выявляющих антиген вируса SARS-CoV-2, используют моноклональные антитела (МкАТ) к нуклеокапсидному белку N.

Цели и задачи. Задачей работы являлось получение коллекции гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к белку нуклеокапсида коронавируса SARS-CoV-2, с использованием генно-инженерных белков и дальнейший отбор антител для диагностики.

Материалы и методы. Мышей линии BALB/c иммунизировали двумя разными экспрессированными в *E.coli* рекомбинантными полноразмерными белками нуклеокапсида коронавируса SARS-CoV-2: NCC/opt-28 и NP-17. Схема иммунизации в обоих случаях состояла из трёхкратного введения антигена в полном (в первый раз) и неполном адьювантах Фрейнда с интервалами 1-2 месяца и дозой 10-20 мкг/мышь. Бустерную дозу (суммарно около 1 мг антигена) вводили как внутривенно, так и внутривенно за 1-3 дня до слияния спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышиной миеломы NS1 с помощью ПЭГ-4000. Культуру после гибридизации вели на селективной среде НАТ. Позитивные гибридомы отбирали в непрямом твердофазном ИФА с использованием рекомбинантных NCC/opt-28 и NP-17. Изотип антител определяли набором «Bio-Rad», индекс аффинности (ИА) — с помощью 4М и 6М растворов мочевины. Гибридомы, синтезирующие антитела с высокими ИА и титрами в реакции с рекомбинантными N-белками, клонировали методом лимитирующих разведений. МкАТ нарабатывали в мышах, очищали аффинной хроматографией на белке А

и синтезировали конъюгаты с пероксидазой хрена или с коллоидным золотом. С помощью пероксидазных конъюгатов антитела первичных гибридом разделили на группы с помощью конкурентного ИФА. Первичный подбор пар МкАТ для сэндвич-варианта ИФА делали для выявления рекомбинантного антигена NP-17. Далее подбирали оптимальные пары МкАТ для определения природного N-белка вируса SARS-CoV-2 в мазках из носа и ротоглотки больных (далее биологический материал). Полученные МкАТ также исследовали для иммобилизации на мембрану и в конъюгате с коллоидным золотом в качестве компонентов набора для выявления N-белка иммунохроматографическим методом.

Основные результаты. Нами получена коллекция «Анти-NCC/opt-28» из 38 гибридом, синтезирующих антитела к рекомбинантному полноразмерному N-белку вируса SARS-CoV-2 NCC/opt-28 (последовательность GenBank MN908947/3). Для увеличения выхода рекомбинантного белка была проведена оптимизация кодонов аминокислот с учётом частот их встречаемости в *E.coli*. Ген нуклеокапсида был синтезирован *de novo* из олигонуклеотидов. Полученная последовательность была подтверждена секвенированием. Для гибридомных антител были определены титры в культуральных супернатантах и индексы аффинности в реакции с NCC/opt-28. 17 лучших по этим показателям гибридом отклонировали, антитела наработали в мышах, очистили, получили пероксидазные конъюгаты. С помощью этих конъюгатов МкАТ разделили на 5 групп по конкуренции за связывание с NCC/opt-28. Пилотный подбор МкАТ из коллекции «Анти-NCC/opt-28» для выявления рекомбинантного антигена сэндвич-вариантом ИФА показал, что с помощью пар наших моноклональных антител мы смогли получить наибольшую чувствительность 270 пг/мл. Лучшими для сорбции оказались 3 МкАТ группы конкуренции МкАТ 4A8-25, совсем плохо показали себя в иммуносорбенте 3 МкАТ группы 5B3-29, остальные дали промежуточные результаты. Лучшие в иммуносорбенте МкАТ, которые позволяли определять 10-20 пг/мл рекомбинантного белка в паре с конъюгатом коммерческого МкАТ К6, при выявлении природного вирусного N-белка в биологическом матери-

але показывали максимальную чувствительность 120 пг/мл. Методом конкурентного ИФА мы постарались найти аналогов МкАТ К6, но таких не оказалось в коллекции «Анти-NCC/opt-28». При исследовании МкАТ К6 в реакции с разными рекомбинантными N-белками SARS-CoV-2 нами было показано, что МкАТ К6 даёт низкие титры в реакции с NCC/opt-28, но высокие в реакции с другим рекомбинантным нуклеокапсидным белком SARS-CoV-2, NP-17. Поэтому была проделана работа по получению коллекции антител к NP-17. При получении NP-17 нуклеотидная последовательность нуклеопротеина (NP) изолята Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2 (NC_045512) была оптимизирована по кодонному составу для получения белка в бактериальных клетках *E.coli*. Синтезированный ген был встроен в векторную плазмиду, обуславливающую продукцию целевого нуклеопротеина SARS-CoV-2 в составе белка слияния. Коллекция «Анти-NCC-17» состояла из 385 гибридом, 201 из которых имели обратные титры антител к NP-17 в культуральных супернатантах более 1000, из них 9 % входили в группу конкуренции МкАТ К6. Шесть гибридом с АТ группы К6 были отклонены и для них получены препараты: очищенные антитела и конъюгаты с перокси-

дазой хрена. По результатам конкурентного анализа все эти шесть МкАТ были специфичны к одному эпитопу на NP-17 и в ИФА показали связывание с природным N-белком. П и конструировании ИХА 19 МкАТ из 2-х коллекций были проверены в составе конъюгата с коллоидным золотом и/или для иммобилизации на нитроцеллюлозную мембрану. Из исследованных МкАТ 10 показали способность определять природный N-белок вируса в ИХА. Были отобраны лучшие антитела для иммобилизации на мембрану и для конъюгата, которые позволили получить высокую специфичность и чувствительность анализа (30 пг/мл рекомбинантного белка).

Выводы. Нами получены 2 коллекции гибридом с синтезом антител к нуклеокапсидному белку коронавируса SARS-CoV-2 с использованием двух полноразмерных рекомбинантных аналогов этого белка. На основании анализа свойств гибридомных антител 23 гибридомы были отклонены и их антитела использованы в конструировании сэндвич-варианта ИФА и ИХА. Найдены МкАТ, позволяющие выявлять с высокой чувствительностью N-белок коронавируса в биологических образцах как в сэндвич-варианте ИФА, так и в быстром иммунохроматографическом анализе.

НЕЛИНЕЙНАЯ ВЗАИМОЗАВИСИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЯ УРОВНЕЙ АНТИ-SARS-COV-2 IGG С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМ АBBOTT И EUROIMMUN

Иванов А.В.^{1,2}, Уварова М.А.¹, Семенова Е.В.³

¹ АО «Северо-Западный центр доказательной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Клиника высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

Введение. В настоящее время существует значительное количество тест-систем, используемых для определения уровня антител к SARS-CoV-2, которые различаются как методами, лежащими в основе тестирования, так и используемыми антигенными мишенями и классами измеряемых иммуноглобулинов. Сравнение результатов, полученных с помощью различных тестов, выявляет их существенное расхождение при переводе в рекомендованную ВОЗ стандартную единицу измерения уровня специфических иммуноглобулинов BAU/mL.

Целью исследования является создание алгоритма унификации результатов измерений уровней анти-SARS-CoV-2 IgG с помощью тест-систем, основанных на разных методологических платформах — ИФА EuroImmun и ИХЛ Abbott.

Материалы и методы. Был применён пакет статистического анализа ROOT. Зависимости погрешности измерения от уровня антител для двух тест-систем аппроксимировали степенными функциями методом наименьших квадратов. Нелинейная зависимость значений уровней антител, измеренных с помощью тестов Abbott и Euroimmun, была аппроксимирована асимптотической функцией.

Результаты. В исследовании приняли участие 112 человек, перенесших COVID-19, подтверждённый РВ-ПЦР. Для каждого измерен уровень IgG с применением ИФА и ИХЛ, рассчитаны погрешности измерений. В ряде случаев, особенно при высокотитре антител, зафиксировано почти 20-ти кратное превышение значений уровней антител в BAU/mL, измеренных с помощью тест-системы Abbott Architect по сравнению с результатами, полученными с помощью тест-системы Euroimmun (477.32 и 20.64). Полученные результаты подтверждают ошибочность использования единого линейного коэффициента преобразования в BAU/мл для уровней анти-SARS-CoV-2 IgG, измеренных Abbott и EuroImmun. Для описания взаимозависимости уровней анти-SARS-CoV-2 IgG Abbott и EuroImmun предлагается функция $y=18/\pi \arctan(0,0009x)$ и калькулятор, позволяющий легко пересчитать результаты, полученные с помощью этих тест-систем.

Вывод. Нелинейный характер взаимозависимости измеренных уровней антител к SARS-CoV-2 от их величины является одной из основных причин расхождения результатов тестов при переводе в BAU/mL с использованием линейного коэффициента пересчёта. Предлагаемый алгоритм исправляет данную неточность.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ COVID-19 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ШТАММА ВОЗБУДИТЕЛЯ

Санькова М.В., Полуэктова В.Б.

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Введение. Даже после официального окончания пандемии COVID-19 возбудитель инфекции SARS-CoV-2 продолжает циркулировать среди населения и вызывать тяжёлые формы этого заболевания. Беспрецедентные меры принимаются для организации медицинской помощи SARS-CoV-2 инфицированным людям, однако лечение пациентов COVID-19 тяжелого течения остаётся серьёзной проблемой здравоохранения. По разным статистическим данным смертность в этой группе достигает 85%. Успешное лечение осложнённого течения COVID-19 во многом зависит от своевременной и точной оценки состояния пациентов и коррекции проводимой у них терапии. Учитывая, что варианты, провоцирующие развитие тяжелой формы COVID-19, имеют отличительные признаки строения и характеризуются разными клиническими проявлениями, представляется актуальным сравнительный анализ особенностей COVID-19 разной этиологии.

Цель исследования. Изучить клинико-лабораторные особенности течения COVID-19 в зависимости от штамма возбудителя для оптимизации лечения этого заболевания.

Материал и методы. В соответствии с требованиями PRISMA, основу данного научно-аналитического метаанализа составили рандомизированные контрольные испытания, когортные исследования, исследования случай-контроль и перекрестные исследования. Использовались данные электронных библиотек Cochrane Library, e-Library.ru и КиберЛенинка, научно-образовательных ресурсов Global Health, Elsevier и Embase, а также поисковых систем «Академия Google», MEDLINE, PubMed-NCBI и RSCI Scopus.

Результаты. Показано, что многочисленные мутации SARS-CoV-2 модифицируют биологические и иммуногенные характеристики вируса, что играет решающую роль в формировании клинической картины заболевания и во многом определяет стратегию терапии (Таблица). Среди всех мутировавших штаммов были выделены несколько, вызывающих особую обеспокоенность, вариантов, которые способны провоцировать развитие тяжелой формы этого заболевания. Это, в первую очередь, Альфа-штамм, который впервые зарегистрирован в Великобритании в сентябре 2020 года. Относительного Уханьского варианта он имеет семнадцать мутаций, восемь из которых находятся в белке шипа и обуславливают его более высокую контагиозность. Тяжёлая форма при V.1.1.7 отмечалась у пациентов, которые были существенно моложе и имели меньше сопутствующих заболеваний. Выявлялись более высокие уровни лабораторных показателей. Нейтрализующая активность была снижена незначительно и в целом сохраняла чувствительность к моноклональным антителам. Южноафриканский Бета-штамм, обнаруженный в декабре 2020 года, характеризовался девятью мутациями, определяющими его большую способность ускользания от моноклональных антител. Заболевание стало протекать в тяжёлой форме у молодых людей с сопутствующими заболеваниями. Большую озабоченность учёных вызвал бразильский Гамма-штамм, появившийся в декабре 2020 года и содержащий десять мутаций, обуславливающих его более высокое сродство к клеткам и увеличение контагиозности. Расположение большинства этих мутаций в иммуногенных доменах S-белка стало причиной возникновения у него резистентности к терапии моноклональными антителами.

ТАБЛИЦА. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ COVID-19 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ШТАММА ВОЗБУДИТЕЛЯ

	Контагиозность возбудителя	Тяжесть течения COVID-19	Эффективность препаратов моноклональных антител	Выделение вируса из дыхательных путей
Альфа-штамм линия V.1.1.7.	⇕	⇕	↓	13 дней
Бета-штамм линия V.1.351.	↑	⇕	⇓ только сочетанное применение имдевимаба и казиривимаба	14 дней
Гамма-штамм линия V.1.1.28	⇓	⇕	⇓ полная резистентность к терапии	↑ 15 дней
Дельта-штамм линия V.1.617	⇕	⇓	⇓ только применение этесевимаба	⇕ 18 дней
Омикрон линия V.1.1.529	⇓	⇓	⇓ только сочетанное применение эвусельда и сотровимаба	⇓ 8 дней

Примечание: ⇕ — в сравнении с исходным Уханьским вариантом

Индийский *Дельта-штамм*, возникший в октябре 2020 года продемонстрировал наличие десяти мутаций в шиповом белке, которые отличали его сокращенным инкубационным периодом, повышенной вирусной нагрузкой на организм человека и более частым развитием осложнённого течения заболевания даже у полностью здоровых молодых людей и беременных женщин. Эта линия имела пониженную чувствительность к моноклональным антителам. Выявленный в ноябре 2021 *Омикрон* имел более тридцати мутаций в шиповидном белке и показывал значимое увеличение вирусной контагиозности. Более низкая его репликационная

способность объясняла меньшую тяжесть заболевания. В группе риска тяжёлого течения находились пожилые люди, люди, страдающие хроническими заболеваниями, и дети.

Заключение. Высокая мутационная активность вируса SARS-CoV-2 приводит к постоянному изменению его контагиозности и модификации основных патогенетических процессов. Это обуславливает большую вариабельность клинических синдромов и восприимчивость к лечению моноклональными антителами, что требует постоянного пересмотра подходов к терапии в зависимости от штамма возбудителя.

ВАРИАНТЫ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К SARS-COV-2 У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ ВРЕМЕННОГО ИНФЕКЦИОННОГО ГОСПИТАЛЯ

Решетникова И.Д.^{1,2*}, Агафонова Е.В.^{1,3}, Хакимов Н.М.^{1,3}, Тюрин Ю.А.^{1,3}, Шайхразиева Н.Д.⁴

¹ ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора;

² ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»;

³ ГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет»;

⁴ Казанская государственная медицинская академия — филиал ГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, серомониторинг, медицинские работники

VARIANTS OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO SARS-COV-2 IN MEDICAL WORKERS OF A TEMPORARY INFECTION HOSPITAL

Reshetnikova I.D.^{1,2}, Agafonova E.V.^{1,3}, Khakimov N.M.^{1,3}, Tyurin Yu.A.^{1,3}, Shaykhrazieva N.D.⁴

¹ Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia

² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

³ Kazan State Medical University, Kazan, Russia

⁴ Kazan State Medical Academy — Branch of the Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Kazan, Russia

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, seromonitoring, medical workers,

Актуальность. Изучение особенностей формирования и длительности сохранения гуморального иммунного ответа на новую коронавирусную инфекцию в группе высокого риска заражения — у медицинских работников (МР) является актуальным направлением исследований. Цель и методы. Изучить динамику выработки специфических IgG, IgM к SARS-CoV-2 у МР временного инфекционного госпиталя (ВИГ) для оценки трендов индивидуально-иммунного ответа. Ежемесячный мониторинг антител проводили с июня 2020г. по июль 2021г. методом двухстадийного прямого твердофазного ИФА тест-системой «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ»(Россия) у 68 невакцинированных МР (26,5% мужчин и 73,5% женщин, средний возраст составил $43,5 \pm 1,51$ лет, 52,9% врачей, 36,8% среднего и 10,3% младшего медицинского персонала), у 69,1% в анамнезе клинические проявления COVID-19 (среди них 42,7% перенесли инфекцию в лёгкой форме, 20,6% — в

среднетяжёлой и 5,9% — в тяжёлой форме, 30,9% — бессимптомно). Результаты. Выделены три группы по динамике IgM: M0 –IgM в крови отсутствовали ($50 \pm 5,7446\%$); M1 –IgM сохранялись в течение 1-2 месяцев с последующим быстрым снижением титра ($16,176 \pm 3,7943\%$); M2 –IgM сохранялись на протяжении трех и более месяцев ($33,824 \pm 5,1033\%$). По динамике IgG МР были разделены на четыре группы: G0 — медленный тренд снижения титра IgG, нет превышения 95% верхней доверительной границы индивидуального тренда ни в одной из взятых проб ($19,2 \pm 4,7\%$); G1 — быстрый тренд снижения титра IgG, нет превышения 95% верхней доверительной границы индивидуального тренда начиная с 3 месяца после начала наблюдения ($4,4 \pm 2,5\%$); G2 — неравномерный тренд снижения IgG, есть превышения 95% верхней доверительной границы индивидуального тренда, начиная с 3 месяца после начала наблюдения ($69,1 \pm 5,6\%$);

G3 –тренд увеличения титра иммуноглобулинов IgG ($7,353 \pm 3,1651\%$). Выводы. Результаты серологического мониторинга могут быть использованы для прогнозирования эпидемиологической ситуации, планирования

мероприятий специфической и неспецифической профилактики COVID-19, персонализации вакцинации МР, как группы повышенного риска инфицирования, а так же научного обоснования программ иммунореабилитации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ВАЛИДАЦИИ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ RT-LAMP В КАЧЕСТВЕ МЕТОДА ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ SARS COV-2

Дё К.Г.^{1,2}, Касимов А.Э.^{1,2}, Хегай Т.Р.^{1,2}

¹ Научно-производственный комплекс ООО ROSSA, г.Нурафшан, Узбекистан

² Институт Иммунологии и Геномики человека АН РУз, г.Ташкент, Узбекистан

Введение. На сегодняшний день экспресс диагностика занимает одну из ключевых позиций в молекулярной диагностике не только коронавирусной инфекции, но и многих других патологий благодаря ряду преимуществ таких как скорость, удобство, простота и гибкость. Во время пандемии COVID-19 возникла острая необходимость в массовом, более быстром чем классические методы (такие, как ОТ-ПЦР), простом и не уступающем в точности методе выявления РНК SARS CoV-2. В связи с возникшей потребностью специалистами компании ROSSA была проведена валидация разработанного набора реагентов для качественного выявления РНК SARS CoV-2 современным методом колориметрической RT-LAMP (Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification) не требующего высокой квалификации персонала и дорогостоящего оборудования.

Целью исследования является изучение соответствия колориметрического набора RT-LAMP к РНК SARS CoV-2 требованиям стандартов для IVD молекулярной диагностики по чувствительности, специфичности, прецизионности и устойчивости.

Материалы и методы. Были использованы образцы аналитической панели с известной концентрацией (SARS-CoV-2 Analytical Q Panel 01 SCV2AQP01-A, Qnostics, Block 1 Todd Campus, West of Scotland Science Park Glasgow, G20 0XA, Scotland, UK). Клинические образцы — пробы, взятые со слизистых оболочек верхних дыхательных путей содержащие РНК SARS CoV-2, а также образцы от условно здоровых пациентов, хранившиеся в биобанке Института Иммунологии и Геномики Человека АН РУз (Ташкент, Узбекистан).

Для сравнительных испытаний были использованы наборы реагентов для экстракции ДНК/РНК «MagSorb NA», для ОТ-ПЦР «ROSSAmed COVID-19 RT-PCR», «Ампли-Прайм SARS CoV-2», (ООО «НекстБио» Россия); набор реагентов для проведения колориметрической RT-LAMP с визуальной детекцией результатов «ROSSAmed COVID-19 ISOTHERM» (ООО ROSSA, Узбекистан), с использованием амплификаторов qTower3 Analytik Jena AG, Германия; для RT-LAMP использовали твердотельный термостат с блоком для пробирок 0,2 мл TDB-120, Biosan, Латвия.

Основные результаты. Аналитическая чувствительность определялась при помощи 8 количественно охарактеризованных образцов стандартной панели в концентрациях от 6 до $1,7 \text{ Log}_{10}$ ГЭ/мл, исследованных в

6 повторях. Специфичность реагентов оценивалась при помощи образцов стандартной панели (отрицательный образец стандартной панели в 20 повторях) и 50 клинических образцов, ранее охарактеризованных как не содержащие РНК SARS CoV-2. Характеристика прецизионности проводилась путем оценки повторяемости и воспроизводимости полученных результатов. Повторяемость оценивалась путем тестирования одних и тех же положительных и отрицательных образцов в условиях одной лаборатории, одним оператором, с использованием одного и того же оборудования в течение 24 часов. Воспроизводимость оценивалась путем тестирования одних и тех же положительных и отрицательных образцов в разных лабораториях, разными операторами, разными приборами, в разное время. Устойчивость метода проверялась путем преднамеренных колебаний параметров проведения анализа и условий окружающей среды.

Согласно полученным результатам, набор реагентов для определения РНК SARS CoV-2 методом колориметрической изотермической петлевой реакции амплификации с обратной транскрипцией успешно прошел все этапы валидации. Чувствительность RT-LAMP составила 104 ГЭ/мл, специфичность — 100%. При анализе прецизионности, все полученные результаты были повторяемы внутри одной лаборатории и воспроизводимы в других лабораториях. Набор показал себя как устойчивый к изменениям условий окружающей среды и колебаниям параметров проведения анализа, а также способен сохранять полученные результаты (изменение цвета реакционной смеси) не менее 48 часов.

Заключение. Метод колориметрической петлевой изотермической реакции амплификации является простым, доступным методом и дает достоверные и надежные результаты качественного определения РНК SARS CoV-2 в биологических образцах. Проведенная валидация метода при помощи набора реагентов «ROSSAmed COVID-19 ISOTHERM» (ROSSA, Узбекистан) по показателям чувствительности, специфичности, прецизионности, устойчивости подтверждает соответствие полученных значений основным критериям к IVD молекулярной диагностики. Метод рекомендован для первичного скрининга и экспресс-тестирования на наличие РНК SARS CoV-2 так как для его проведения не требуется дорогостоящего ПЦР оборудования и высококвалифицированного персонала.

АНАЛИЗ УРОВНЕЙ МОЛЕКУЛ TREC И KREC В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ COVID-19 С ЛЕТАЛЬНЫМ ИСХОДОМ

Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В.

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Инфекционный процесс, вызываемый вирусом SARS-CoV-2 — «новая коронавирусная инфекция COVID-19» — может сопровождаться развитием тяжелых состояний, вызванных интерстициальными пневмониями, острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС), полиорганной и острой дыхательной недостаточностью, прогрессирующих в жизнеугрожающие состояния, и зачастую требующих экстренных мер. К факторам риска развития осложнений и летальных исходов относят возраст старше 65 лет, сопутствующие хронические легочные и сердечно-сосудистые заболевания, гипертонию, сахарный диабет. Как известно, выраженность лимфопении является одним из факторов, влияющих на прогноз исхода заболевания. В качестве молекулярных маркеров степени выраженности Т- и В-лимфопений могут служить уровни в периферической крови небольших молекул кольцевой ДНК Т-рецепторных эксцизионных колец (англ. T-cell receptor excision circles — TREC) и каппа-делеционных рекомбинационных эксцизионных колец (англ. kappa-deleting recombination excision circles — KREC), соответственно. Молекулы TREC и KREC — внехромосомные молекулы ДНК, формирующиеся в процессе дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, соответственно. Уровень молекул TREC в периферической крови отражает количество наивных Т-лимфоцитов, созревающих в тимусе, а уровень молекул KREC отражает уровень вновь дифференцированных наивных В-клеток, покидающих костный мозг.

Цель исследования: провести сравнительный анализ уровней молекул TREC и KREC в крови выживших и умерших больных COVID-19, а также в крови условно здоровых людей.

Задачи исследования:

1) сформировать группы образцов периферической крови, полученных от больных COVID-19 людей, в зависимости от исхода заболевания, а также контрольную группу образцов крови;

2) определить уровни молекул TREC и KREC в образцах крови в каждой группе;

3) провести сравнительный анализ TREC и KREC между контрольной группой, группой выздоровевших и умерших пациентов.

Материалы и методы. Материалом служили образцы крови, полученные от пациентов с подтвержденным диагнозом Новая коронавирусная инфекция COVID-19, наблюдавшихся в инфекционных отделениях Клинической больницы №122 им. Л.Г. Соколова и Университетской клиники Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова. Всего было проанализировано 1028 образцов, полученных от инфицированных людей, 90 из которых

— образцы крови от пациентов с летальным исходом. В контрольную группу вошли 717 образцов крови от условно здоровых людей. Для проведения анализа из лейкоцитарной фракции крови экстаргировали суммарную ДНК и проводили количественную Real-time ПЦР с одновременной амплификацией ДНК-фрагментов TREC, KREC, а также фрагментов нормировочных генов HPRT и RPP30, с использованием набора «TREC/KREC-Amp PS» (ФБУН «НИИ Пастера», Санкт-Петербург). Статистическую обработку данных проводили с применением пакетов программного обеспечения GraphPad Prism 5, StatTech и Microsoft Excel 2010. При проведении сравнительного статистического анализа применяли критерий Манна-Уитни. Для оценки диагностической значимости уровней целевых аналитов в крови применяли метод анализа ROC-кривых.

Результаты. Среди умерших пациентов в 63,7% случаев уровни молекул TREC или KREC были снижены относительно соответствующих возрастных норм. В 20,9% случаев у таких пациентов были одновременно снижены и TREC, и KREC. При этом абсолютное количество лимфоцитов пациентов со сниженными TREC/KREC также находилось ниже границы нормы.

Статистический анализ с применением критерия Манна-Уитни показал достоверное снижение медианных значений концентраций молекул TREC и KREC у пациентов с инфекцией COVID-19 (как выживших, так и летальных) по сравнению с контрольной группой ($p < 0,0001$, 95% ДИ). Достоверные различия уровней молекул TREC между выборками умерших и выздоровевших отсутствовали ($p = 0,3289$, 95% ДИ), однако были установлены статистически значимые различия уровней молекул KREC у умерших пациентов по сравнению с выжившими ($p = 0,0019$, 95% ДИ).

Достоверное снижение уровня молекул KREC в крови в случае летальных исходов свидетельствует о выраженных нарушениях в процессах дифференцировки В-лимфоцитов в костном мозге, что может быть одним из факторов, влияющих на исход заболевания. Для оценки диагностической значимости количественного анализа уровня KREC в крови тяжелых пациентов проведен ROC-анализ по параметру KREC у умерших и выживших больных. Определена величина параметра площадь под ROC-кривой AUC (area under the curve), которая составила $0,63 \pm 0,029$ с 95% ДИ: $0,541 — 0,656$, что говорит о средней силе прогностической модели наступления смерти пациента в зависимости от этого параметра. Модель является статистически значимой ($p = 0,002$). Пороговое значение уровня KREC (точку cut-off) определяли по наивысшему значению индекса Юдена. Пороговое значение KREC, которому соответствовало наивысшее значение индекса Юдена, составило $14,55$ копий/ 10^5 клеток. Построенная модель прогнозирует

наступление летального исхода пациента при значении уровня KREC в крови ниже данной величины.

Заключение. Выявление лабораторных маркеров высокого риска смертности больных с COVID-19 играет важную роль для совершенствования алгоритмов оказания помощи тяжелым пациентам и повышения их выживаемости. Количественная оценка уровней TREC и KREC позволяет детектировать нарушения в процессах

лимфопоэза, что на фоне плохой клинической картины способствует выявлению пациентов с повышенным риском летального исхода, и помогает вовремя назначить таким пациентам специализированное лечение. Таким образом, анализ уровней TREC и KREC можно отнести к методам превентивной персонифицированной диагностики, направленной на повышение выживаемости больных.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА RS2066845 ГЕНА *NOD2* У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕГКОЙ И ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ ТЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ COVID-19

Рогачева А.В.¹, Александрова А.А.^{1,2}, Гутникова Л.В.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия

² Медицинский центр «Наука», Ростов-на-Дону, Россия

Введение: Ген *NOD2* кодирует рецептор распознавания образов (PRR) NOD-подобного рецептора (NLR), который играет ведущую роль в формировании врожденного иммунного ответа. Установлено, что генетические вариации гена *NOD2* могут быть факторами восприимчивости к разнообразным вирусным патогенам (Al-Anazi et al., 2019; Казумян и др., 2022). В частности, полиморфизм rs2066845 ассоциирован с рисками повышенной восприимчивости к вирусу гепатита В.

Актуальность: Изучение полиморфного локуса rs2066845 одного из самых значимых генов врожденного иммунитета у пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию.

Цель исследования: Исследовать ассоциацию полиморфного локуса rs2066845 гена *NOD2* с тяжестью течения COVID-19.

Задача исследования: провести сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма rs2066845 гена *NOD2* в группах пациентов с легкой и тяжелой формой течения коронавирусной инфекции.

Материалы и методы: В рамках данного исследования проведено обследование 73 пациента в возрасте от 20 до 80 лет. Рекрутинг пациентов осуществлялся на базе медицинского центра «Наука» в период с 12.03.21 по 08.07.2022 г. Исследование проводилось в интерморбидный период (не менее 2-х месяцев после заболевания). По степени тяжести перенесенного заболевания согласно Временным методическим рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению коронавирусной инфекции от 22.02.2022 все пациенты были разделены на 4 группы: бессимптомное протекание инфекции, легкая форма болезни, среднетяжелая и тяжелая степень инфекции. Для анализа 4 группы были объединены в две, условно, «легкую» и «тяжелую» группы.

В первую, «легкую», группу вошли пациенты с бессимптомным протеканием инфекции и легкой формой заболевания (всего 39 человек, из них 26 женщин и 13 мужчин), в «тяжелую» — пациенты со среднетяжелой и тяжелой степенью инфекции (всего 34 человека, 23 женщины и 11 мужчин). Расчет проводили в общей группе и в группах,

разделенных по гендерному критерию, в отдельности.

Генотипирование производилось методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе Bio-RAD Real-time CFX96 Touch.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных подходов, используемых при проведении популяционно-генетических исследований. Все анализируемые выборки прошли тест на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с использованием метода χ^2 ($\alpha=0,05$). Допущенный уровень значимости для всех полученных результатов $p<0,05$.

Результаты:

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма rs2066845 выявил повышение встречаемости рецессивного аллеля А среди пациентов мужского пола со среднетяжелой и тяжелой формой протекания заболевания (31,82%) по сравнению с легкой и бессимптомной (7,69%) (OR=5,6; 95% CI: 1,02-30,62; $p=0,03$). Частота встречаемости гетерозиготного генотипа GA среди пациентов мужского пола со среднетяжелой и тяжелой формой протекания заболевания (45,45%) по сравнению с легкой и бессимптомной (15,38%) OR=4,58; 95% CI: 0,67-31,20; $p=0,04$).

Выводы: Таким образом, полученные нами данные указывают на повышенные риски инфицирования среднетяжелой и тяжелой формой течения коронавирусной инфекцией у носителей рецессивного аллеля А гена *NOD2* (rs2066845) и гетерозиготного генотипа GA мужского пола.

Список использованной литературы:

1. Al-Anazi M. R. et al. Genetic variations of *NOD2* and MD2 genes in hepatitis B virus infection //Saudi Journal of Biological Sciences. — 2019. — Т. 26. — №. 2. — С. 270-280;
2. Казумян М. А. и др. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *NOD2* У ДЕТЕЙ С РЕКУРРЕНТНЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ //Pediatriya named after GN Speransky. — 2022. — №. 2. «Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018»

ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ COVID-19

Иванова Е.С.^{1,2}, Прокофьев В. Н.¹

¹ Южный федеральный университет (ЮФУ), г. Ростов-на-Дону, Россия

² Медицинский центр «Наука», г. Ростов-на-Дону, Россия

Введение: В патогенезе инфекции COVID-19 принимают участие различные процессы, включая, активацию ренин-ангиотензинового пути, избыточное высвобождение цитокинов, дисфункцию эндотелия и окислительный стресс (ОС). ОС определяется как дисбаланс между токсичными формами кислорода и антиоксидантами, который может привести к необратимому окислительному повреждению липидов, дезоксирибонуклеиновой кислоты или белков.

Цель исследования: оценить показатели свободно-радикальных процессов у пациентов после перенесенной инфекции COVID-19 различной степени тяжести.

Задачи исследования:

1. Определить интенсивность свободно — радикальных процессов у пациентов, перенесших COVID-19 в легкой и тяжелой форме в отдаленные сроки после окончания заболевания.

2. Оценить атиноксидантную емкость ферментативных систем пациентов, перенесших COVID-19 в легкой и тяжелой форме в отдаленные сроки после окончания заболевания.

Материалы и методы: Интенсивность свободно-радикальных процессов определяли в сыворотке крови у 275 пациентов с COVID-19: 206 пациентов с легкой степенью тяжести и 69 пациентов с тяжелой формой инфекции. Критерием включения в исследование было наличие положительного результата полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на SARS-CoV-2. Рекрутинг пациентов осуществлялся в период с 12.03.2021 г по 08.07.2022 г. Исследование проводилось в интерморбидный период

(не менее 2х месяцев после заболевания). В сыворотке крови пациентов определяли показатели перекись индуцированной люминолзависимой хемилюминесценции по скорости развития быстрой вспышки, светосуммы свечения быстрой вспышки и светосуммы свечения за 10 секунд развития реакции. Исследования проведены на полуавтоматическом хемилюминесцентном анализаторе Berthold Autolumat Plus LB 953 (Berthold Technologies, GmbH).

Результаты: Среднее значение времени развития быстрой вспышки люминолзависимой хемилюминесценции у пациентов с легкой формой инфекции составило $0.473 \text{ (сек)} \pm 0,09$; у пациентов с тяжелой формой — $0.478 \text{ (сек)} \pm 0,09$. Медианы светосуммы быстрой вспышки (отн. ед.) составляли $271,03 \pm 183,06$ у пациентов с легким течением инфекции и $246,17 \pm 131,08$ у пациентов с тяжелой формой. Среднее значение светосуммы свечения за 10 сек.(отн.ед.) составило $1334,41 \pm 832,9$ у пациентов с легкой формой COVID-19 и $1253,04 \pm 652,63$ у пациентов с тяжелым течением заболевания.

Заключение: Время развития быстрой вспышки люминолзависимой хемилюминесценции практически не отличалось у пациентов с легкой и тяжелой формой инфекции. Светосумма быстрой вспышки и светосумма свечения за 10 сек была снижена на 10 % и 6 % соответственно у пациентов, которые 6 месяцев назад перенесли COVID-19 в тяжелой форме. Таким образом, у пациентов, перенесших 6 месяцев назад COVID-19 в тяжелой форме, отмечается снижение антиоксидантной емкости ферментативной системы и уровня защиты организма от свободно-радикального окисления.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ПОСТКОРОНАВИРУСНОМ СИНДРОМЕ

Носова В.О., Вечканов Е.М., Плотников А.А.

Академия Биологии и Биотехнологии им. Д. И. Ивановского Южного Федерального Университета, Ростов-на-Дону, Россия

Актуальность. Причинами эндотелиальной дисфункции у пациентов с COVID-19 могут являться цитокиновый шторм и иммуноопосредованное повреждение эндотелиоцитов. Цитокины и белковые провоспалительные медиаторы служат ключевыми факторами, способствующими эндотелиальной дисфункции. Когда макрофаги распознают и поглощают патогены, высвобождаются TNF- α или IL-1, что приводит к тому, что эпителиальные клетки начинают презентировать E-селектин, ICAM-1 и VCAM-1 на своей поверхности. Эти молекулы адгезии способны взаимодействовать

с циркулирующими лейкоцитами. Лейкоциты проникают в пораженную патогеном ткань, вызывая воспаление, которое дополнительно способствует развитию эндотелиальной дисфункции. VEGF регулируют проницаемость кровеносных сосудов, а также стимулируют их пролиферацию. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и его рецептор (VEGFR) играют немаловажную роль в большинстве патологических процессов ангиогенеза. Оценка ферментативного синтеза оксида азота (NO) эндотелиальной NO-синтазой (eNOS) также важно для диагностики функционального состояния эндотелия. Ре-

зистин имеет полипептидную природу, выполняет функции гормона. Уровень содержания данных биохимических маркеров в сыворотке крови был изучен с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА).

Цель. Цель данной работы состояла в определении уровня содержания в сыворотке крови у пациентов с посткоронавирусным синдромом биомаркеров эндотелиальной дисфункции: VCAM-1, ICAM-1, VEGF-1, NOS-3, NOx– и резистина, для чего был использован метод ИФА.

Методы. Для исследования были взяты образцы сыворотки крови 20-ти женщин в возрасте 35–50 лет, которые перенесли COVID-19 в разной степени тяжести, но без сопутствующих заболеваний. В первую группу вошло 7 человек с легкой степенью тяжести, во вторую — 13 человек со средней степенью тяжести. Сыворотка крови условно здоровых женщин использовалась в качестве контроля. Определение VCAM-1 осуществлялось методом иммуноферментного анализа фирмы «Affymetrix eBioscience» (BMS232/BMS232TEN), ICAM-1 — набором фирмы «Affymetrix eBioscience» (BMS201/BMS201TEN), VEGF-1 — набором фирмы «Affymetrix eBioscience» (BMS201/BMS201TEN), NOx– и NOS-3 — набором фирмы «R&D Systems» (KGE001), резистина — набором фирмы «BioVendor» (RD191016100) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Обработка статистических данных осуществлялась с помощью пакета программ «STATISTICA — 10.0» путем попарного сравнения двух независимых выборок (групп): 0–1, 0–2, 1–2 на основе непараметрического критерия Манна-Уитни, так как массив обрабатываемых данных не подчинялся нормальному распределению. Результаты были представлены в виде

медианы и межквартильного размаха, который составлял 25 % и 75 %.

Выводы. Были выявлены следующие закономерности: уровень VCAM-1 у пациенток со средней формой заболевания увеличился сильнее, чем у пациентов с легкой тяжестью заболевания на 1,5%, что коррелирует со степенью тяжести заболевания. В обоих случаях наблюдалось усиление экспрессии VCAM-1 по сравнению с контрольной группой: для 1-й группы на 54,5%, а для 2-й на 58,4%. Уровень экспрессии ICAM-1 также увеличился в двух испытуемых группах, причём у пациенток со средней формой заболевания на 1,8% сильнее, чем у пациенток с легкой степенью тяжести. По сравнению с контрольной группой в 1-й показатель ICAM-1 был увеличен на 15,2%, а для 2-й увеличился на 28,5%. В случае VEGF-1 было обнаружено более резкое усиление экспрессии у пациенток с легкой тяжестью в сравнении с женщинами со средней формой заболевания на 10,48%. Для 1-й и 2-й групп показатель VEGF-1 по сравнению с контрольной увеличился на 66,3% и 47,6%. Результаты исследования эндотелиальной NO-синтазы продемонстрировали увеличение продукции NOS-3 в сравнении с контрольной группой, причём сильнее это оказалось выражено для пациенток средней формы на 1,7%. По сравнению с контрольной группой данный показатель был увеличен для 1-й группы на 13,3% и для 2-й группы на 15,7%. Также были получены статистически значимые отличия в уровне резистина, причём его уровень в плазме крови у пациенток средней формы заболевания был выше на 3,49% по сравнению с пациентками с легкой степенью тяжести. По сравнению с контрольной группой в 1-й показатель резистина был увеличен на 35,8%, а для 2-й увеличился на 64,2%.

НОВАЯ КОРОНАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ В ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ

Старкова О.Г., Тихомиров Д.С., Овчинникова Е.Н., Мисько О.Н., Солдатова Т.А., Крылова А.Ю., Туполева Т.А., Гапонова Т.В.

ФГБУ «Национальный медицинский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

Введение. За последние три года было представлено множество разработок в отношении диагностики, лечения и предотвращения распространения COVID-19. Кроме того, накоплен обширный статистический материал по заболеваемости и смертности, длительности репликации вируса в организме человека, скорости нарастания иммунной прослойки в первый год пандемии, длительности поствакцинального иммунитета и т.д.

С начала объявления пандемии в ФГБУ «Национальный Медицинский Исследовательский центр гематологии» Минздрава России (далее Центр) велась активная исследовательская работа по оценке скорости появления и длительности постинфекционного и поствакцинального иммунитета у доноров крови и ее компонентов; по оценке заболеваемости новой коронавирусной инфекцией среди пациентов и сотрудников гематологического стацио-

нара; по оценке сохранности противовирусных антител в донорской плазме, подвергшейся глубокой заморозке в течении всего срока карантинизации, а также по оценке посттрансфузионных реакций у реципиентов, получивших трансфузии плазмы, содержащей антитела к SARS-CoV-2.

Цель: изучить динамику маркеров SARS-CoV-2 у доноров крови, сотрудников и пациентов гематологического стационара.

Материалы и методы. В работу были включены результаты тестирования на наличие антител к SARS-CoV-2 12 314 образцов от доноров крови и ее компонентов, прошедших донацию в период с 29.04.2020 по 08.04.2021 гг., и результаты тестирования на наличие SARS-CoV-2 ПНК 107 470 образцов мазков носо- и ротоглотки от пациентов и сотрудников Центра, полученных в период с апреля 2020 по конец января 2022 г. Для оценки сохранности противо-

вирусных IgG исследованы 505 образцов позитивной плазмы, проходящей карантинизацию при температуре ниже -25°C спустя 1,5; 2; 3; 4; 5 и 6 мес. Для сравнения частоты возникновения нежелательных реакций проанализированы 9152 трансфузии плазмодержащих компонентов (2059 свежезамороженной плазмы (СЗП), 327 криосупернатантной плазмы (КСН), и 6766 доз криопреципитата (КП)), содержащих и не содержащих антитела к возбудителю COVID-19. Оценка нежелательных реакций осуществлялась после каждой трансфузии. Исследование на наличие РНК SARS-CoV-2 проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием наборов реагентов «ПЦР-РВ-2019-nCov» ООО «Синтол». Тестирование на антитела к SARS-CoV-2 проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «SARS-CoV-2-IgG-ИФА», производства ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, ООО «ХЕМА» Россия.

Результаты. За период наблюдения частота выявления антител к коронавирусу у безвозмездных доноров, сдающих кровь на базе Центра выросла с 8,52% до 58,09%, что было связано как с быстрым распространением инфекции по территории России, так и с активной кампанией по вакцинации, стартовавшей в декабре 2020 г. Показана хорошая корреляция между эпидемиологической обстановкой в РФ и ростом частоты выявления противовирусных антител у доноров Центра.

Анализ результатов исследований 107 470 образцов биологического материала от пациентов и сотрудников Центра показал, что общая частота выявления РНК вируса составила 1,15% (1318 образцов). При этом в группах сотрудники и пациенты возбудитель был выявлен в 1,42% и 1,09% случаев ($p < 0,001$) соответственно. Несмотря на подверженность пациентов гематологического стационара развитию тяжелых инфекционных осложнений, лабораторные маркеры возбудителя COVID-19 обнаруживались у них реже, чем у сотрудников центра. Проанализирована частота инфицированности в группах больных с опухоле-

выми и неопухолевыми заболеваниями системы крови. Показано отсутствие достоверной разницы в выявлении РНК SARS-CoV-2 в этих группах (1,24% и 0,92% случаев соответственно, $p = 0,147$).

При оценке сохранности IgG к SARS-CoV-2 в плазмодержащих компонентах донорской крови после глубокой заморозки в течении периода карантинизации было показано, что лишь в 2% образцов плазмы, положительной перед заготовкой, после разморозки получены негативные результаты тестирования SARS-CoV-2 IgG. Сохранность антител в плазме после разморозки не зависела от их исходного уровня и не была связана с длительностью глубокой заморозки.

Анализ нежелательных реакций после трансфузий СЗП, КСН и КП, заготовленных от серопозитивных и серонегативных доноров, показал отсутствие достоверных различий в частоте возникновения нежелательных реакций у реципиентов как в целом, так и по отдельным компонентам донорской крови.

Заключение. В ходе исследования показано, что динамика нарастания гуморального иммунитета против SARS-CoV-2 среди доноров, прошедших донацию в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, коррелировала с эпидемиологической обстановкой в РФ. У сотрудников гематологического стационара частота выявления возбудителя COVID-19 была достоверно выше, чем у пациентов (1,42% против 1,09%, $p < 0,001$). У пациентов с опухолевыми и неопухолевыми заболеваниями системы крови достоверных различий в этой частоте получено не было. Показано, что сохранность антител в плазме донорской крови после разморозки не зависела от их исходного уровня и не была связана с длительностью глубокой заморозки. Анализ нежелательных реакций после переливания компонентов донорской крови на основе плазмы показал отсутствие достоверной разницы между трансфузиями свежезамороженной и криосупернатантной плазмы, а также криопреципитата, заготовленных от доноров, позитивных и негативных по наличию IgG к SARS-CoV-2.

ДИНАМИКА ВЫЯВЛЕНИЯ ШТАММОВ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2 В УРАЛЬСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ В 2021-2023 ГГ.

Озерова А.Н., Бакштановская И.В., Степанова Т.Ф.

ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора, Тюмень, Россия

Актуальность. За период исследований новой коронавирусной инфекции в мире установлено более сотни геновариантов. Вспышки заболевания коронавирусной инфекции связаны с появлениями новых штаммов вируса SARS-CoV-2, обусловленных генетическими изменениями.

Цель работы — исследование методом фрагментного секвенирования последовательности S-белка SARS-CoV-2 для выявления мутаций, характерных для наиболее опасных вариантов, и анализ динамики их появления у больных новой коронавирусной инфекцией из регионов Уральского федерального округа (УрФО).

Материалы и методы. В соответствии с приказом Роспотребнадзора № 56 от 19.02.2021 г. и МР 3.1.0272-22 «Молекулярно-генетический мониторинг штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции» методом фрагментного секвенирования по Сэнгеру исследовали нуклеотидную последовательность S-белка, имеющего ведущее значение в попадании вируса в клетку. Биоматериал на исследование (носоглоточные мазки, мокрота) поступал от жителей 6 субъектов УрФО: Тюменской, Курганской, Челябинской и Свердловской областей, Ямало-Ненецкого (ЯНАО) и Ханты-Мансийского (ХМАО) автономных округов.

Фиксировали обнаружение исходного варианта, альфа-, бета-, гамма-, дельта-, омикрон-штаммов SARS-CoV-2.

Из биопробы при помощи коммерческого набора «Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) выделяли РНК вируса SARS-CoV-2, образцы с высокой вирусной нагрузкой ($Ct \leq 24$) использовали в качестве матрицы в реакции обратной транскрипции для получения кДНК. Для амплификации участков, содержащих нуклеотидные изменения разных вариантов вируса, использовали олигонуклеотидные праймеры в соответствии с Протоколом Университета Женевы и Протоколом ARTIC v.3. Методом вложенной ПЦР с использованием коммерческих наборов реагентов Encyclo Plus PCR kit («Евроген») получали 2 фрагмента ДНК. С помощью горизонтального электрофореза в 1%-ом агарозном геле проверяли наличие искомым ампликонов, проводили их очистку с использованием коммерческих наборов Exo-CIP (New England Biolabs). Очищенные фрагменты служили матрицей для реакции секвенирования, ее продукты очищали от терминаторов изопропанолом и денатурировали формамидом. Анализ проводили в секвенаторах Applied Biosystems 3500 или SeqStudio.

Результаты. За 2,5 года (февраль 2021 — июнь 2023) геноварианты определены в 2890 пробах от заболевших жителей субъектов УрФО. У 84 (2,9%) пациентов был подтвержден диагноз внебольничной пневмонии, 191 (6,6%) человек на момент забора пробы переносили коронавирусную инфекцию бессимптомно, у 2056 (71,2%) зафиксированы признаки ОРВИ разной степени тяжести, у 559 (19,3%) не указаны данные о заболевании.

В качестве референс-штамма использовали hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (EPI_ISL_402124) (обозначен далее как «уханьский» вариант).

В марте-июне 2021 г. «уханьский» геновариант преобладал во всех субъектах региона: его доля составляла 100% проб, поступивших из Челябинской области, 94% — Тюменской, 65-66% Свердловской, Курганской области и ХМАО, 55% ЯНАО. В этот период регистрировались мутации, характерные для альфа-, бета- и гамма-штаммов. Впервые геновариант альфа был установлен у пациентов УрФО в следующем хронологическом порядке: ЯНАО (15.03.2021) — ХМАО (19.03.2021) — Свердловская область (23.03.2021) — Тюменская область (29.03.2021) — Курганская область (13.05.2021). Наибольший процент пациентов с альфа-штаммом зарегистрирован в ЯНАО (45%). Бета- и гамма-штаммы в единичных случаях были обнаружены в биоматериале больных из ХМАО и Свердловской области (преимущественно завозные случаи из Турции и ОАЭ). Альфа-, бета- и гамма-штаммы не были обнаружены в материале больных Челябинской области.

С июля 2021 г. в поступающих из субъектов УрФО пробах выявлены мутации дельта-штамма (Свердловская область (16.07.2021), Тюменская область (20.07.2021), Курганская область (21.07.2021), ЯНАО (23.07.2021), ХМАО (01.08.2021), Челябинская область (18.11.2021)), этот геновариант менее чем за месяц, полностью вытеснил другие геноварианты SARS-CoV-2. В течение июля 2021 года процент пациентов с мутациями дельта-штамма составлял от 57% в Тюменской области (здесь и в Свердловской области у 2% еще выявлен альфа-штамм) до 95-96% в ЯНАО, Свердловской и Курганской областях и 100% в ХМАО. В августе уже у всех обследованных выявлялся только геновариант «дельта».

В начале 2022 года быстро произошла его замена на штамм «омикрон»: в биоматериале от 4-12 января были обнаружены мутации, характерные для омикрон-штамма (Свердловская область — 04.01.2022, Челябинская — 06.01.2022, ХМАО — 07.01.2022, ЯНАО, Тюменская и Курганская область — 12.01.2022). В течение января 2022 г. доля геноварианта «дельта» еще составляла 32% в пробах из Свердловской области, 30% в пробах из Курганской, 10% — в Челябинской, 7-8% в ЯНАО и ХМАО, и только 4% в Тюменской области. После 06.02.2022 этот вариант в поступающих из субъектов УрФО пробах более не обнаруживался. Отдельные пробы с идентификацией Omicron (BA.2) появились в январе (Свердловская область — 09.01.2022, Челябинская — 12.01.2022, ХМАО — 12.01.2022, Курганская область — 18.01.2022, ЯНАО — 22.01.2022, Тюменская область — 23.01.2022). Проба с идентификацией Omicron (BA.4/5) впервые обнаружена в ЯНАО (18.07.2022), затем — в Курганской области (24.07.2022), в Тюменской области (31.07.2022), в ХМАО (02.08.2022). Впервые геновариант Omicron (XBB 1.1) обнаружен у болеющего жителя Тюменской области (08.01.2023), затем у пациентов с территории ХМАО (10.01.2023) и ЯНАО (15.01.2023), в образце от больного из Курганской области данный геновариант найден позже (10.03.2023). Штамм Omicron (XBB 1.16) установлен в 3-х образцах от жителей Тюменской области (впервые 08.04.2023). Геновариант Omicron (XBB 1.5) был обнаружен в образце жителя Тюменской области (23.01.2023), затем у пациента из ХМАО (14.02.2023), после в пробе из Курганской области (06.04.2023) и образце из ЯНАО (08.05.2023). Отдельные мутации, характерные для штамма Omicron (XBB 1.9.1) выявлены в мазках пациентов из Тюменской области (18.04.2023), Курганской области (07.05.2023) и ЯНАО (08.05.2023). Образцы от жителей Челябинской и Свердловской областей в институт не поступают с начала августа 2022 г.

Среди биопроб с установленным геновариантом вируса, 462 (16%) образца из 2890 поступили от вакцинированных жителей УрФО. Наибольший процент вакцинированных приходится на Челябинскую область 31,6%, в порядке убывания — ЯНАО (27,3%) и ХМАО (26,6%), 7,4% проб поступили от привитых жителей Тюменской области, 6,0% образцов из Курганской области и 0,9% — Свердловской области. 64 образца (2,2%) были доставлены от пациентов, которые заболели после прилета из других стран, при этом 14 больных проходили вакцинацию до путешествия.

По данным исследований, полученных на конец июня 2023 г., из общего числа (2890 проб) в 1847 (63,91%) случаях обнаружен геновариант омикрон. У больных с этим геновариантом в 2,2% случаев наблюдалась внебольничная пневмония, в 85% — признаки ОРВИ и у 5,2% обследованных заболевание протекало бессимптомно.

Выводы. Выявление геновариантов коронавируса на территории регионов УрФО происходило позднее, чем в мире и в Российской Федерации в целом. Динамика их обнаружения соответствует общей эпидемической ситуации, с первоочередным появлением новых вариантов в более крупных городах и территориях с более активным авиасообщением. Данные молекулярно-генетических исследований являются важным компонентом эпидемиологического надзора для принятия управленческих решений по предотвращению дальнейшего распространения SARS-CoV-2.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА ИММУНОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Кадырова Р.А., Вакин В.С., Грудинин М.П., Лиознов Д.А.

ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Аденовирусы (Ад) человека широко используются в качестве векторов при конструировании вакцин против таких опасных инфекций как грипп, малярия, туберкулез, вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция, а также инфекций, вызываемых вирусами Эбола, MERS-CoV и SARS-CoV-2. Наличие специфических нейтрализующих антител (НАТ) к Ад у населения потенциально может приводить к снижению эффективности ревакцинации такими вакцинами [1].

Материалы и методы. В реакции нейтрализации (РН) исследовали сыворотки крови 302 взрослых добровольцев, однократно привитых векторной вакциной Ad5-nCoV, и 93 сыворотки добровольцев группы плацебо. Сыворотки собирали в день вакцинации (Д0) и через 28 дней после вакцинации (Д28). Последовательные 2-кратные разведения сывороток инкубировали с 100ТЦД50 Ад 5 типа (Ад5) штамм Аденоид 75 (АТСС, VR-5), а затем вносили в клеточную культуру А 549 (карцинома легкого человека). Результаты РН учитывали через 72 ч методом иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител к гексону Ад [2]. За титр НАТ принимали последнее разведение сыворотки, при котором наблюдалось полное ингибирование репродукции Ад5.

Для изучения динамики изменения титров НАТ к Ад-вектору в составе вакцины Ad5-nCoV применен графический метод оценки иммуногенной активности вирусов [3]. Для анализа использованы парные сыворотки крови добровольцев, полученные в Д0 и Д28. Для опытной группы и группы плацебо вычисляли кратность прироста НАТ (КрП) как отношение титра НАТ в Д28 к титру НАТ в Д0. Сыворотки

добровольцев из группы Ad5-nCoV были разделены на подгруппы в зависимости от титров НАТ к Ад5 в Д0, для каждой подгруппы вычисляли среднюю кратность прироста НАТ.

Результаты. По данным РН в Д0 НАТ к Ад5 были выявлены в 121 из 302 сывороток группы Ad5-nCoV и в 32 из 93 сывороток группы плацебо. Практически во всех сыворотках титры НАТ к Ад5 были низкими ($\leq 1:160$), только в 6 сыворотках группы Ad5-nCoV титры НАТ к Ад5 составили 1:320. В Д28 в группе Ad5-nCoV количество сывороток с НАТ к Ад5 увеличилось до 193, при этом в 129 сыворотках титры НАТ были низкими ($\leq 1:160$), в 64 сыворотках титры были высокими (> 160), максимальные титры НАТ к Ад5 достигали значений 1:1280 (2 сыворотки). В группе плацебо на Д28 не произошло значительных изменений.

Введение вакцины Ad5-nCoV добровольцам в 42,1% случаев не приводило к изменению титров НАТ к Ад5 в исследованных сыворотках (КрП=1), 2-кратный прирост титров НАТ был определен в 16,6% исследованных сывороток. Максимальная величина КрП=256 была определена в одном случае. В группе плацебо в 93,5% исследованных сывороток КрП НАТ к Ад5 составила 1, т.е. титр НАТ сохранялся на уровне Д0.

Для группы Ad5-nCoV дополнительно был проведен анализ зависимости показателя КрП НАТ к Ад5 в Д28 от исходных титров в Д0. Для этого сыворотки вакцинированных добровольцев были разделены на 7 групп в зависимости от титров НАТ к Ад5 в Д0 (от 1:5 до 1:320, соответственно), для каждой группы была рассчитана средняя КрП (таблица 1).

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНЯЯ КРАТНОСТЬ ПРИРОСТА ТИТРА НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К АДЕНОВИРУСУ 5 ТИПА НА Д28 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДНЫХ ТИТРОВ В Д0

Титр НАТ к Ад5 в Д0	Кол-во человек	Средняя кратность прироста НАТ к Ад5 в Д28
5	181	10,6
10	23	15,5
20	29	14,1
40	27	5,9
80	20	3,8
160	16	2,1
320	6	1,5

Применение графического метода позволило выявить ярко выраженную зависимость между исходными титрами НАТ к Ад5 и кратностью прироста этого показателя после введения вакцины Ad5-nCoV в группе привитых добровольцев. Значительный (6-16-кратный) прирост уровня НАТ к Ад5 наблюдали в группе добровольцев с отсутствием или с низкими титрами НАТ к Ад5 (1:10 — 1:40) в Д0.

Выводы. Введение вакцины на основе Ад5-вектора приводит к образованию НАТ к компонентам вектора, при этом

степень иммунного ответа зависит от исходного уровня НАТ. Исследование иммуногенных свойств Ад-векторов и оценка их влияния на эффективность презентации целевого антигена являются необходимым этапом при разработке и внедрении новых генно-инженерных препаратов на их основе.

Работа выполнена в рамках клинического исследования по протоколу: «Многоцентровое, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование в параллельных группах по оценке эффективности,

реактогенности и безопасности рекомбинантной вакцины Ad5-nCoV против новой коронавирусной инфекции у взрослых добровольцев», код протокола Prometheus_Rus.

Литература:

1. Santra S, Seaman MS, Xu L, Barouch DH, Lord CI, Lifton MA, Gorgone DA, Beaudry KR, Svehla K, Welcher B, Chakrabarti BK, Huang Y, Yang ZY, Mascola JR, Nabel GJ, Letvin NL. Replication-defective adenovirus serotype 5 vectors elicit durable cellular and humoral immune responses in nonhuman primates. *J Virol.* 2005 May;79(10):6516-22. doi: 10.1128/JVI.79.10.6516-6522.2005. PMID: 15858035; PMCID: PMC1091731.

2. The Diagnostic Potential of Monoclonal Antibodies to Adenovirus / T. A. Timoshicheva, I. V. Amosova, M. P. Grudin // *Applied Biochemistry and Microbiology.* — 2022. — Vol. 58, No. 7. — P. 873-877. — DOI 10.1134/S0003683822070079.

3. Анализ иммуногенности вакцинного штамма вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в пандемию и постпандемический период (2009-2014 гг.) с использованием графического метода / В. С. Вакин, И. В. Амосова, Е. М. Войцеховская [и др.] // *Инфекция и иммунитет.* — 2022. — Т. 12, № 1. — С. 158-164. — DOI 10.15789/2220-7619-IAO-1693.

ДНК-ВАКЦИНА ПРОТИВ COVID-19, КОДИРУЮЩАЯ ПОЛИЭПИТОПНЫЙ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНОГЕН

Боргоякова М.Б., Рудомётов А.П., Старостина Е.В., Задорожный А.М., Кисакова Л.А., Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Пьянков О.В., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А.

ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, РФ

Введение. Коронавирус SARS-CoV-2, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром, достаточно быстро накапливает мутации, в результате чего меняется его антигенный портрет. Так, вакцины первого поколения, разработанные на основе штамма ухань, уже обладают низкой эффективностью против циркулирующих в 2023 г. штаммов вируса. Было показано, что Т-клеточный ответ является более консервативным в отношении разных субтипов вируса SARS-CoV-2 и направлен в том числе на белки, которые не являются мишенями нейтрализующих антител и, следовательно, в отсутствие отбора менее изменчивы.

Целью данной работы было разработать искусственный Т-клеточный иммуноген, состоящий из консервативных фрагментов различных белков вируса SARS-CoV-2, и исследовать его иммуногенные и протективные свойства на мышах линии BALB/c.

Материалы и методы. Т-клеточные эпитопы предсказали на основе базы данных Immune Epitope Database 2.22 (IEDB 2.22). Предсказанные эпитопы, которые рестриктируются человеческими и мышиными главными комплексами гистосовместимости, были объединены в кластеры, представляющие фрагменты из отдельных вирусных белков SARS-CoV-2 (из белков S, N, M и E). К N-концу иммуногена добавляли эпитоп PADRE, к C-концу — маркерный эпитоп EPRFDYVDRFYKTLR. Также к гену, кодирующему целевой иммуноген, была присоединена последовательность, кодирующая убиквитин. Оценка экспрессии целевого гена проводили с использованием клеток HEK293 стандартными методами ОТ-ПЦР (анализ наличия целевой мРНК) и иммуноблотинга (анализ наличия целевого белка). Для оценки иммуногенности созданных конструкций использовали самок мышей BALB/c массой 16-18 г. Все эксперименты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с протоколами, утверждёнными Биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Мыши получали 100 мкг ДНК внутримышечно дважды с интервалом три недели, контрольная группа состояла из

не иммунизированных животных. Через две недели после второй иммунизации одна часть мышей была выведена из эксперимента и проанализирована на формирование иммунного ответа с помощью методов ELISpot и ICS, а другую часть заражали Гамма-вариантом вируса SARS-CoV-2 (штамм hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021), дозой 50 ИД50. Через четыре дня заражённых мышей выводили из эксперимента и анализировали вирусную нагрузку в лёгких животных с помощью ПЦР в реальном времени.

Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием непараметрического анализа Манна—Уитни в программе GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software). Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Результаты. Для создания Т-клеточного иммуногена мы использовали подход, основанный на дизайне искусственных антигенов, объединяющих множество эпитопов из основных белков вируса SARS-CoV-2 (S, N, M и E) в одной молекуле. Консервативность доминантных эпитопов в составе данных фрагментов составила более 87% в отношении штаммов ухань, дельта, гамма и омикрон. В составе данных фрагментов были предсказанные CTL- и Th-эпитопы, рестриктируемые MHC I и MHC II человека и мыши. После обогащения последовательности, кодирующей спроектированный иммуноген, вспомогательными последовательностями (маркер, универсальный Т-хелперный эпитоп, убиквитин), оптимизировали её кодонный состав, синтезировали и клонировали в составе векторной плазмиды pVAX1, получив целевую плазмиду, обозначенную как pBSI-COV-Ub.

С помощью ОТ-ПЦР и иммуноблотинга была подтверждена экспрессия целевого гена в клетках HEK293, трансфицированных плазмидой pBSI-COV-Ub, как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. Белковый продукт, выявленный с помощью иммуноблотинга, представлял из себя смесь дискретных белков, что свидетельствует об эффективном процессинге Т-клеточного иммуногена в клетке, обеспеченном в том числе присоединением убиквитина.

Иммуногенность и протективность полученной конструкции были исследованы на модели мышей линии BALB/c.

Через две недели после второй иммунизации у мышей были изъяты селезенки с последующим выделением спленоцитов, которые были протестированы с помощью ELISpot и ICS на наличие специфических цитокин-продуцирующих Т-клеток. Сыворотки, выделенные из крови иммунизированных животных, не показали способности специфически связываться в ИФА с рекомбинантными белками S и N вируса SARS-CoV-2, что было обусловлено отсутствием В-клеточных эпитопов в составе иммуногена.

Данные IFN- γ -ELISpot показали, что в результате иммунизации плазмидой pBSI-COV-Ub сформировался вирусспецифический Т-клеточный иммунитет: количество Т-лимфоцитов, секретирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию вирусными пептидами среди 1 млн клеток, в среднем составило 122, что достоверно более чем в 4 раза выше количества специфических Т-лимфоцитов, обнаруженного у мышей контрольной группы.

При окрашивании внутриклеточных цитокинов (ICS) для клеток животных, иммунизированных pBSI-COV-

Ub, была показана значительная индукция IFN- γ , IL-2-, TNF- α -продуцирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию вирусными пептидами, что свидетельствует о формировании выраженного вирусспецифического Т-хелперного и цитотоксического ответа.

Через две недели после второй иммунизации проводили заражение штаммом, к которому чувствительны мыши линии BALB/c. В результате было выявлено более чем тысячекратное снижение вирусной нагрузки у животных, иммунизированных плазмидой pBSI-COV-Ub, по сравнению с контрольными животными (3,45 Ig, 32,48 Ct vs 21,00 Ct, $p < 0,01$).

Заключение. ДНК-вакцина pBSI-COV-Ub, кодирующая искусственный полиэпитопный иммуноген, в состав которого входят цитотоксические и Т-хелперные эпитопы из белков S, N, M и E вируса SARS-CoV-2, обеспечивает индукцию вирусспецифического Т-клеточного ответа (Т-хелперов и ЦТЛ) у мышей линии BALB/c, который формирует защиту от заражения вирусом SARS-CoV-2.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

ВЛИЯНИЕ ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2 НА ПАТОЛОГИЮ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Хабаров О.Р.¹, Зима Д.В.², Безруков О.Ф.², Зяблицкая Е.Ю.²

¹ГБУЗ «Городская больница №1 им. Н.И. Пирогова», Севастополь, Россия

²ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь, Россия

Введение. Актуальность темы связана с возросшим интересом к влиянию COVID-19 на функцию щитовидной железы. Согласно данным, ежедневно публикуемым Ресурсным центром COVID-19 пандемия затронула более 667 млн человек, в результате чего погибло более 6 млн человек [John Hopkins University of Medicine. Coronavirus Research Center, 2023]]. Множественные ее последствия заняли центральное место в клинической практике и общественном здравоохранении и после стихания пандемии. Инфекция оказывает влияние на весь организм, в том числе и на эндокринную систему, нарушение деятельности которой может быть вызвано такими механизмами, как: прямое повреждение вирусом эндокринной железы или опосредованные эффекты на ось гипоталамус-гипофиз, системное воспаление вследствие секреции биологически активных веществ, нарушение кровообращения и аутоиммунные реакции за счет антигенной мимикрии [Parolin M. et al. 2020; Chen W. et al. 2021]. Поскольку врачи терапевтического и хирургического эндокринологического профилей отмечали увеличение числа случаев дисфункции щитовидной железы у пациентов с диагнозом COVID-19, стали актуальны исследования взаимосвязи между новой коронавирусной инфекцией и патологией щитовидной железы. Фундаментальная наука нацелилась на выявление и понимание основных патофизиологических процессов, возникающих при взаимодействии вируса и данного органа, что является клинически значимой информацией для диагностики, профилактики и лечения пациентов. Университетская клиника и диагностическая морфологическая лаборатория при ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»

(Симферополь) также отметила влияние пандемии в изменении структуры хирургической заболеваемости эндокринологических пациентов, в связи с чем, мы: 1) приняли участие в мультицентровом исследовании университета Кальяри (Италия), оценившим общемировую специфику организации лечения больных с тиреоидной патологией; 2) провели ретроспективное изучение региональных особенностей заболеваемости хирургической патологией щитовидной железы; 3) инициировали фундаментальное исследование патогенеза повреждения ткани железы в модельном эксперименте на гуманизированных лабораторных грызунах.

Цель исследования — изучить патогенетические механизмы и эффекты влияния SARS-COV-2 на развитие болезней щитовидной железы. Для достижения цели поставлены следующие задачи: 1) оценить изменение структуры заболеваемости населения Республики Крым патологией щитовидной железы на протяжении периода пандемии COVID-19; 2) на экспериментальной модели проверить гипотезу влияния SARS-COV-2 на развитие патологии щитовидной железы.

Материал и методы. Использован метод ретроспективного анализа данных структуры заболеваемости хирургической патологией щитовидной железы среди пациентов отделения эндокринной хирургии Университетской клиники путем изучения заключений морфологической диагностики на предоперационном этапе (1280 пунктатов тонкоигльной аспирационной биопсии (ТАПБ) и гистологической верификации после хирургического лечения (514 патогистологических исследований пациентов, перенесших опе-

рацию на щитовидной железе). Результаты проанализированы непараметрическими методами по критерию хи-квадрат в Excel, числовые показатели различий считали значимыми, статистически достоверными при ошибке P менее 5%. Также выполнен модельный эксперимент на лабораторных гуманизированных мышах B6.Cg-Tg (K18-ACE2) 2 PrImn Ifnar1- (Stock No. 035041, The Jackson Laboratory, США). Они экспрессируют на поверхности респираторного тракта ACE2 рецептор, при помощи которого SARS-CoV-2 связывается с макроорганизмом при инфекционном процессе. Двухмесячных мышей самцов и самок по 5 особей разделили на группы: 1) контроль без экспериментального воздействия, 2) с моделью интраназального инфицирования SARS-CoV-2. Мыши размещены с соблюдением требований безопасности в SPF-клетках в режимном учреждении, с соблюдением стандартных условий содержания и ведения эксперимента, а также с учетом гуманного отношения и разрешения биоэтической комиссии КФУ (прот. № 4 от 12.04.2022 г). После выведения животных из эксперимента было выполнено гистологическое исследование щитовидных желез.

Основные результаты. На фоне общемировой тенденции, что с момента своей вспышки в начале 2020 года пандемия COVID-19 отвлекла ресурсы от несрочных и плановых процедур, которые привели к задержкам в диагностике и лечении, а также к увеличению числа новообразований щитовидной железы на поздних стадиях во всем мире, мы получили иные данные по региону Республики Крым. Нами выявлено снижение доли выявления рака в женской популяции во время пандемии (30%) по сравнению с допандемическим периодом (39%, при $P \leq 0,05\%$). Мы объясняем это более частым обращением к врачу в связи с явлениями дисфункции железы, характерными для COVID-19 и увеличением доли аутоиммунной активации железы и тиреоидитов, вызванных непосредственно вирусом SARS-CoV-2, снижающим удельный вес рака среди проведенных ТАПБ и биоматериала от операций. Среди мужчин процент злокачественных новообразований также выше до пандемии (56%), но за счет активного вовлечения железы в инфекционный процесс COVID-19 резко возрастает ги-

перфункциональная патология (преобладают токсические аденомы, зобы, аутоиммунные тиреоидиты) и доля рака в общей структуре болезней щитовидной железы, требующей оперативной помощи снижается до 25,0% ($P \leq 0,005$). Однако, выявленные опухоли (преимущественно папиллярные карциномы) относятся к низкой категории риска, являются микрокарциномами и крайне редко имеют экстращитовидное распространение. У мышей, перенесших тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС) после заражения новой коронавирусной инфекцией, на гистологических срезах щитовидных желез в остром и подостром периоде обнаружены явления лимфоидной инфильтрации стромы железы, зобообразования путем гипертрофии и деформации тиреоидных фолликулов, высланных высокопризматическим эпителием с признаками гиперфункции выработки и резорбции коллоида. Мы считаем перспективными дальнейшие экспериментальные исследования для изучения влияния терапии глюкокортикостероидами, нестероидными противовоспалительными средствами и противовирусными препаратами. Также интерес представляет применение молекулярно-диагностических методик для изучения межклеточных цитокиновых взаимодействий в процессе воспалительного процесса в органе.

Заключение. Основываясь на патофизиологии инфекции SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 часто наблюдается тиреотоксикоз из-за подострого тиреоидита, связанного с антигенной мимикрией вируса и активации трехуровневой регуляторной оси «гипоталамус-гипофиз-щитовидная железа». Учитывая данный факт на фоне иммунодепрессивной терапии и общего негативного влияния на организм перенесенного ТОРС, вызванного коронавирусом данного типа, важно прицельное внимание к щитовидной железе таких пациентов, важна соответствующая оценка субфебрилитета и сердечноvascularных расстройств и целесообразны дальнейшие фундаментальные исследования данной темы для изучения отдаленных последствий пандемии.

Финансирование. Исследование поддержано Программой развития ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» «Приоритет-2030» №075-15-2021-1323.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО S-БЕЛКА SARS-COV-2 НА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕК293Т ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Косенко М.Н., Онхонова Г.С., Иматдинов А.Р., Прудникова Е.Ю., Иматдинов И.Р., Суслопаров И.М., Рыжиков А.Б.

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Новосибирск, Россия

Введение. Значительный интерес структурно-функциональных исследований вирусных белков представляют оболочечные гликопротеины, которые формируют димеры или тримеры на вирусной оболочке и ответственны за связывание вируса с клеткой-мишенью и проникновение вируса в клетку. Из-за решающей роли гликопротеинов вирусной оболочки в связывании клеточных рецепторов важно получать информацию об их структуре для понимания вирусной инфекции и разработки терапевти-

ческих и профилактических стратегий. Структурный анализ комплексов и локализация сайтов связывания малых молекул на тримере спайк-белка коронавируса позволит понять возможную стратегию противовирусной терапии.

Целью исследования была разработка методики получения в клетках эукариот рекомбинантного тримерного S-белка вируса SARS-CoV-2 высокой степени чистоты и гомогенности для дальнейших структурных исследований.

Материалы и методы. Нарботка белка проводилась путем транзientной экспрессии в клетках HEK293T. В качестве репортера экспрессии использовался eGFP. Эффективность экспрессии рекомбинантного белка определялась путем обработки изображений трансфецированного монослоя, полученных на имиджинговой станции Agilent BioTek Cytation 5 с помощью программного обеспечения Gen5 3.10. S-белок очищался посредством аффинной хроматографии с последующей гель-фильтрацией на хроматографической системе AKTA Pure (GE). Чистота белка оценивалась с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Анализ электрофореграммы проводился с помощью программного обеспечения GelAnalyzer 19.1. Биологическая активность полученного белка оценивалась по его связывающей способности, измеренной методом биослойной интерферометрии с рекомбинантным белком-аналогом человеческого ACE-2 (Sanyou Biopharmaceuticals) с полигистидиновой меткой. Эксперименты по измерению рецепторной специфичности проводились на приборе Octet RED96e (ForteBio). Оценка гомогенности раствора проводилась методом динамического светорассеяния на приборе Photocor Compact-Z (ООО «Фотокор»).

Результаты. В результате исследования была разработана методика экспрессии рекомбинантного тримерного S-белка SARS-CoV-2 в клетках HEK293T с последующей очисткой с помощью жидкостной хроматографии. Чистота полученного белка составила более 95%. Методом биослойной интерферометрии показана способность связывать ACE2 с константой диссоциации $K_d = 15 \pm 1$ нМ, что подтверждает сохранение биологической активности очищенного рекомбинантного тримерного белка. Методом динамического светорассеяния подтверждена высокая степень гомогенности полученного раствора и определен гидродинамический радиус S-белка $R = 13,56 \pm 3,68$ нм при параметре полидисперсности — 0.074.

Заключение. Ведение поэтапного контроля с привлечением современных средств обработки полученных данных позволило добиться высокой степени чистоты и гомогенности получаемого биологически активного S-белка, что позволяет его использовать для ультраструктурных исследований. Разработанная методика обладает достаточной гибкостью и может быть использована для получения аналогичных вирусных белков. Работа выполнена за счет финансирования выполнения государственного задания ГЗ-20/21 из федерального бюджета.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА (CRP) И ИНДЕКСОВ ВОСПАЛЕНИЯ, ЗАВИСЯЩИХ ОТ ЗНАЧЕНИЯ CRP, У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

Хаджиева М.Б.^{1,2}, Грачева А.С.^{1,3}, Кузовлев А.Н.¹

¹ ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», г. Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Россия

³ ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва, Россия

Актуальность. С-реактивный белок (CRP) является неспецифическим белком острой фазы и чувствительным биомаркером острой инфекции, воспаления и повреждения тканей [1]. У пациентов с тяжелым течением COVID-19 отмечается выраженное увеличение CRP в сыворотке крови, что указывает на усиление системного воспалительного ответа [2, 3]. COVID-19 характеризуется широким спектром клинических проявлений и потенциальной изменчивостью своего развития, в связи с чем важно изучать динамику изменения потенциальных предикторов тяжелого течения и летального исхода [4].

Цель. У пациентов с COVID-19 с благоприятным и неблагоприятным исходом изучить в динамике CRP и маркеры воспаления, зависящие от значения CRP: отношение CRP к лимфоцитам (C-reactive protein to lymphocytes ratio, CLR) и мультивоспалительный индекс (multi-inflammatory index, MII).

Методы. Индексы воспаления рассчитывались по следующим формулам:

$CLR = CRP / \text{абсолютное количество лимфоцитов};$

$MI = \text{Абсолютное количество нейтрофилов} / \text{абсолютное количество лимфоцитов} \times CRP$

Данные индексы воспаления были вычислены в динамике с момента госпитализации в стационар или ОРИТ с

диагнозом COVID-19 до выписки или госпитальной смерти пациента. Общая выборка из 169 человек старше 18 лет с подтвержденным диагнозом COVID-19 ретроспективно была разделена на две группы в зависимости от исхода: 138 человек составили группу выживших пациентов, 31 человек — группу с летальным исходом; медиана возраста (25- и 75-й процентиля) 57.00 (46.00 — 65.00) и 62.00 (59.00 — 70.00) лет, соответственно ($P = 0.0154$). 53.85% от общей выборки составили мужчины, межгрупповых различий по полу не выявлено. Группы статистически значимо не отличались по частоте встречаемости коморбидных состояний, а также по числу дней с момента появления симптомов до госпитализации, длительности пребывания в стационаре или ОРИТ и степени поражения легких по КТ.

Результаты. Мы выполнили межгрупповой сравнительный анализ значений CRP, CLR, MII на момент госпитализации с диагнозом COVID-19 и в день выписки или госпитальной смерти пациента. При поступлении в стационар/ОРИТ значения данных индексов были статистически значимо выше у пациентов с летальным исходом, чем у выживших (CRP: 128.20 vs 69.95, $P = 0.045$; CLR: 125.00 vs. 61.01, $P = 0.027$; MII: 657.02 vs. 227.43, $P = 0.009$).

На момент выписки или госпитальной смерти пациента

различия зарегистрированы для всех исследуемых индексов (CRP: 125.10 vs 5.60, $P < 0.001$; CLR: 109.55 vs. 3.61, $P < 0.001$; MII: 2450.44 vs. 16.91, $P < 0.001$). При сравнении показателей в первый и последний день госпитализации для выживших пациентов отмечалось снижение индексов к моменту выписки, в то время как для умерших различия не наблюдались.

Чтобы проследить динамику изменения исследуемых показателей, мы рассчитали их значения в течение 30 дней с момента появления первых симптомов с шагом в три дня. Для индексов воспаления CLR и MII значения различались с 10-го по 27-й день заболевания, тогда как для CRP с 10-го по 12-й и с 16-го по 24-й день (таблица 1).

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ЗНАЧЕНИЙ CRP, CLR, MII У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19.

День заболевания	CRP		CLR		MII	
	Выжившие/ Умершие (Медиана)	P-value	Выжившие/Умершие (Медиана)	P-value	Выжившие/ Умершие (Медиана)	P-value
1 — 3	25.99 / 57.40	0.139	16.61 / 71.75	0.170	59.07 / 529.94	0.225
4 — 6	64.39 / 93.75	0.425	76.44 / 66.56	0.934	260.44 / 348.65	0.934
7 — 9	68.89 / 114.65	0.178	86.11 / 86.06	0.242	287.94 / 571.50	0.108
10 — 12	61.6 / 116.3	0.033*	56.76 / 150.90	0.009*	301.36 / 846.53	0.001*
13 — 15	27.25/54.4	0.173	21.36/104.21	0.012*	102.14 / 582.90	0.004*
16 — 18	11.22 / 49.1	0.011*	9.29 / 57.09	<0.001*	44.12 / 480.15	<0.001*
19 — 21	6.99 / 45.4	0.023*	6.80 / 69.75	0.018*	29.22 / 803.15	0.002*
22 — 24	6.23 / 59.85	0.009*	4.15 / 86.89	<0.001*	14.57 / 1006.58	<0.001*
25 — 27	6.00 / 154.20	0.083	5.12 / 183.58	0.018*	29.47 / 1931.56	0.008*
28 — 30	5.0 / 138.3	0.110	3.61 / 195.84	0.152	28.92 / 1952.62	0.08

*Различия статистически значимы.

По результатам логистического регрессионного анализа с поправкой на возраст и пол среди показателей в динамике, достоверные результаты в прогнозировании летального исхода показали CLR на 16 — 18 день заболевания (OR: 1.009; 95% CI: 1.001 — 1.016; $P=0.028$) и MII на 16 — 18 день (OR: 1.000; 95% CI: 1.000 — 1.002; $P=0.01$), 19 — 21 день (OR: 1.001; 95% CI: 1.000 — 1.002; $P=0.011$) и 22 — 24 день заболевания (OR: 1.002; 95% CI: 1.000 — 1.004; $P=0.018$).

Выводы. Значения CRP и индексов CLR, MII в динамике оказались более ценными при прогнозировании исхода COVID-19, чем при поступлении. Значения индексов воспаления как минимум до 15 дня с момента проявления симптомов не позволяют предсказать исход заболевания.

Список литературы

1. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003 Jun;111(12):1805-12. doi: 10.1172/JCI18921. Erratum in: *J Clin Invest.* 2003; 112(2):299;
2. Liu F, Li L, Xu M, et al. Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19. *J Clin Virol.* 2020; 127:104370. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104370;
3. Stringer D, Braude P, Myint PK, et al. The role of C-reactive protein as a prognostic marker in COVID-19. *Int J Epidemiol.* 2021;50(2):420-429. doi: 10.1093/ije/dyab012;
4. Regolo M, Vaccaro M, Sorce A, et al. *J Clin Med.* 2022; 11(8):2235. doi: 10.3390/jcm11082235.

СОБЫТИЯ РЕКОМБИНАЦИИ И КО-ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2, ВЫЯВЛЕННЫЕ В РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТАХ В 2020-2022 ГГ.

Черняева Е.Н.¹, Айгинин А.А., Косенков А.В., Романова С.В.¹, Цыпкина А.В.¹, Лупарев А.Р.¹, Стеценко И.Ф.¹, Гнусарева Н.И.¹, Мацвай А.Д.¹, Савочкина Ю.А.¹, Шипулин Г.А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, 119121 Москва, Россия

Актуальность. Рекомбинация является одним из механизмов эволюции SARS-CoV-2 наряду с возникновением точечных мутаций, инсерций и делеций. В последнее время рекомбинантные варианты SARS-CoV-2 широко распространены в разных странах.

Цель. Провести поиск и анализ геномных последовательностей рекомбинантных вариантов и ко-инфекций различными штаммами вируса SARS-CoV-2, обнаруженных в России в 2020-2022 гг.

Методы. Мазки из носоглотки от пациентов с под-

твержденной инфекцией COVID-19 были собраны в период с 3 февраля 2020 г. по 26 марта 2022 г. клинико-диагностическими лабораториями г. Москвы с последующей передачей в ПЦР-лабораторию Центра стратегического планирования Федерального медико-биологического агентства России («ЦСП» ФМБА России). В исследование было включено 9 336 геномов возбудителя COVID-19, полученных в результате высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina. Для анализа данных использовался алгоритм, разработанный исследовательской группой ФГБУ ЦСП ФМБА России, способный выявлять рекомбинантные штаммы и случаи ко-инфекций путем оценки частот характерных замен в файлах выравнивания сырых прочтений и VCF-файлах. Обнаруженные случаи рекомбинации были подтверждены альтернативными методами секвенирования, анализом главных компонент и филогенетическим анализом.

Выводы. Для определения филогенетической линии секвенированных штаммов SARS-CoV-2 создана база данных нуклеотидных вариантов, характерных для большинства известных линий вируса. База данных содержит 679 833 генома, представляющих 1451 генетическую линию SARS-CoV-2, которые были загружены из базы GISAID 5 июля 2022 г. В результате проведенного исследования были обнаружены рекомбинантные варианты штаммов BA.1 и BA.2, среди которых был идентифицирован новый рекомбинантный вариант, а также ранее обнаруженный. Полученные результаты являются первыми свидетельствами распространения в России рекомбинантных вариантов SARS-CoV-2. Помимо случаев рекомбинации выявлено 14 случаев ко-инфекции: 8 из них содержали в качестве одного из вариантов геном линии Омикрон, 6 — геном линии Дельта, 2 — геном линии Альфа.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 388-00099-23-02.

ДИНАМИКА СОСТАВА МИКРОБИОМА ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 И «ПРИНЦИП АННЫ КАРЕНИНОЙ»: ВСЕ ЛИ МИКРОБНЫЕ «СЕМЬИ НЕСЧАСТНЫ ПО-СВОЕМУ»?

Игнатъева О.А.¹, Гостев В.В.^{2,8}, Тараскина А.Н.¹, Цветкова И.А.², Павлова П.А.^{2,4}, Сулян О.С.², Агеевец В.А.², Лихолетова Д.В.², Чулкова П.С.², Никитина Е.В.², Маткава Л.Р.¹, Терехов М.В.¹, Лисовая Д.Д.¹, Каштанова Д.А.¹, Иванов М.В.¹, Калиногорская О.С.², Авдеева А.А.^{2,4}, Жирков А.А.², Голева О.В.², Захаренко С.М.², Жданов К.В.³, Стрижелецкий В.В.⁴, Гомон Ю.М.⁵, Круглов А.Н.⁶, Ни О.Г.⁶, Носкова Т.В.⁷, Горбова И.В.⁷, Черенкова Г.Ю.⁷, Шлык И.В.⁵, Афанасьев А.А.⁵, Юдин В.С.¹, Макаров В.В.¹, Сидоренко С.В.^{2,8}, Юдин С.М.¹

¹ ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, Москва, Россия

² ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

⁶ ГБУЗ ММКЦ «Коммунарка», Москва, Россия

⁷ ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина»

⁸ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Пандемия COVID-19, уже унесшая к настоящему времени более 6 миллионов жизней, продолжает оставаться серьезной проблемой для здравоохранения во всем мире. Поскольку вирус SARS-CoV-2 передается преимущественно воздушно-капельным путем, то состояние верхних дыхательных путей (ВДП), в особенности свойства населяющих их микробных сообществ, вероятно, играют значительную роль в качестве первой линии защиты от инфекции, и способны оказывать влияние не только на эффективность проникновения вируса в клетки человека, но и на течение заболевания.

Целью данного исследования было сравнение микробиоты ВДП у пациентов с COVID-19 и здоровых людей, а также изучение динамики характеристик микробных сообществ ВДП у пациентов с COVID-19 в процессе лечения.

Материалы и методы. В данное многоцентровое исследование включены 285 пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19, а также 100 здоровых участников. Диагноз COVID-19 верифицировали путем обнаружения

РНК вируса SARS-CoV-2 в образцах из носоглотки с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) наборами «АмплиСенс® COVID-19-ФЛ» («АмплиСенс», Россия).

Во время пребывания в стационаре у пациентов с COVID-19 также забирали от 1 до 3 мазков из носоглотки для метагеномного анализа микробиоты ВДП в трех временных точках (ВТ): при поступлении (ВТ0), в течение первой недели пребывания (ВТ1) и в течение второй недели пребывания (ВТ2). У здоровых участников мазок из носоглотки для метагеномного анализа забирался однократно.

Изучение состава микробиоты ВДП проводили секвенированием гена 16S рРНК с использованием стандартных праймеров, комплементарных участку V3-V4. Для секвенирования использовали прибор MiSeq с набором реагентов MiSeq Reagent Kit v3 на 600 циклов (Illumina, США).

Статистический анализ данных проводили с использованием метода линейной регрессии (Python 3.8). В качестве

ковариат использовали возраст, пол и прием антибиотиков. При множественных сравнениях групп применяли поправку Бонферрони. Метрики альфа-разнообразия рассчитывали с использованием пакета scikit-bio 0.5.6 (Python 3.8). Оценку бета-разнообразия проводили путем анализа главных компонент (ГК) с использованием пакета skbio (Python 3.8).

Результаты. Анализ альфа-разнообразия микробных сообществ ВДП продемонстрировал значительное обеднение микробиоты при COVID-19, на что указывает достоверное снижение индексов Шеннона и Чао у больных по сравнению с контролями ($p = 1,25 \times 10^{-5}$ и $p = 2,73 \times 10^{-7}$, соответственно).

Оценка несходства Брея-Кертиса методом главных компонент (ГК) продемонстрировала четкое разделение пациентов с COVID-19 и здоровых участников на два кластера (ГК1, $p = 0,06$; ГК2, $p = 9,04 \times 10^{-4}$), что свидетельствует о значительных различиях профиля микробиоты ВДП в этих двух группах.

Сравнение таксономического состава образцов позволило выявить достоверное снижение относительной представленности 16 родов микроорганизмов у больных COVID-19 по сравнению с контролями (после поправки на пол, возраст и прием антибиотиков). Наиболее выраженное снижение зафиксировано для родов *Neisseria* (коэффициент регрессии (КР) = 0,14; $p = 2,93 \times 10^{-9}$), *Haemophilus* (КР = 0,14; $p = 1,23 \times 10^{-8}$) и *Limosilactobacillus* (КР = 0,15; $p = 3,41 \times 10^{-11}$). Интересно отметить, что 47 родов микроорганизмов обнаруживались исключительно у пациентов (в том числе *Methylobacterium*, *Lactiplantibacillus*, *Schwartzia* и др.), в то время как у контролей только 2 рода были уникальными (*Oblitimonas* и *Aeromonas*). Вероятно, данное наблюдение может быть следствием нестабильности микробиоты, вызванной вирусом SARS-CoV-2, поскольку микробные со-

общества с нарушенным балансом более склонны к стохастическим изменениям своего состава и появлению новых таксонов. Это согласуется с принципом Анны Карениной, который постулирует большую устойчивость «здоровых» микробиомов по сравнению с микробиомами, подвергшимся какому-либо стрессовому воздействию.

В процессе лечения у пациентов с COVID-19 выявлено незначительное сокращение α -разнообразия с последующим ростом, но различия не достигли уровня статистической значимости. Оценка несходства Брея-Кертиса продемонстрировала, что образцы, полученные на второй неделе лечения (BT2), куда ближе по своему составу к контрольным образцам (ГК 2, $p = 0,51$; ГК3, $p = 0,43$), чем образцы от тех же пациентов, собранные при поступлении в стационар и демонстрирующие достоверное отличие от образцов здоровых (ГК 2, $p = 0,003$; ГК3, $p = 0,004$). Это указывает на то, что в процессе лечения у пациентов с COVID-19 происходит достаточно быстрый сдвиг в сторону «здоровой» микробиоты ВДП. Важно также отметить, что относительная представленность родов *Haemophilus* (КР = 11,67; $p = 2,96 \times 10^{-6}$) и *Neisseria* (КР = 7,57; $p = 0,003$) существенно выросла к BT2 по сравнению с BT0, что также, вероятно всего, указывает на восстановление микробиоты ВДП, поскольку именно эти два таксона преимущественно ассоциированы со «здоровой» микробиотой.

Заключение. Таким образом, COVID-19 связан со значительной дестабилизацией микробиоты ВДП у пациентов, находящихся на стационарном лечении, при этом некоторые таксоны особенно чувствительны к заболеванию. Тем не менее, микробные сообщества ВДП способны сопротивляться этим стохастическим изменениям и со временем вновь стабилизироваться.

ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ТЯЖЕЛОМУ ТЕЧЕНИЮ COVID-19: ОТ ГЕНОВ К БЕЛКУ ЧЕРЕЗ МОДЕЛИРОВАНИЕ IN SILICO

Гусакова М.С., Иванов М.В., Каштанова Д.А., Тараскина А.Н., Ерема В.В., Микова В.М., Лошкарев Р.И., Игнатьева О.А., Акиньшина А.И., Митрофанов С.И., Снигирь Е.А., Юдин В.С., Макаров В.В., Кескинов А.А., Юдин С.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства

Актуальность. С момента начала эпидемии COVID-19 ученые во всем мире пытаются определить генетические характеристики вируса SARS-CoV-2 и человека, которые бы объясняли тяжесть течения данной инфекции. По результатам многочисленных GWA-анализов идентифицированы хромосомные локусы в различных участках генома, которые могут быть ассоциированы с тяжестью течения инфекции. Однако дальнейшее влияние найденных вариантов генов на структуру кодируемых ими белков или их экспрессию остается малоизученным.

Методы. В исследование вошло 5629 заболевших COVID-19 из 51 региона Российской Федерации, из которых 3338 участников вошли в группу легкого и бессимптомного течения, а 2291 — в группу среднего и тяжелого течения. Всем участникам проведено полногеномное

секвенирование, по результатам которого проведено GWA-исследование. На основании полученных результатов построена полигенная шкала риска тяжелого течения COVID-19. Для построения третичной структуры белка FYCO1 использовалась программа AlphaFold II.

Результаты. Обнаружено, что полиморфизмы генов 3p21.31 локуса ассоциированы с тяжелым течением COVID-19. Пик ассоциации приходился на гены *CCR9*, *FYCO1*, *LZTFL1*, *XCR1*, *TMLHE-AS1*, *SCYL2*, среди которых варианты гена *FYCO1* являлись кодирующими. Для миссенс мутаций *FYCO1* построена модель третичной структуры белка, где продемонстрировано изменение пространственной конфигурации Coiled Coil домена.

Выводы. Данная работа объединила этапы исследований от проведения поиска полногеномных

ассоциаций до построения третичных структур белка по найденным вариантам. Выдвигается гипотеза, что рекрутирование вирусом пути аутофагии (autophagy cell pathway) и функциональные замены в гене *FYCO1*,

обнаруженные в ходе GWAS анализа, вероятно могут объяснить биологические причины тяжелого течения COVID-19 и дать направление в поиске потенциальной терапевтической стратегии.

ЭПИТРАНСКРИПТОМНЫЕ МОДИФИКАЦИИ В РАЗВИТИИ ВИРУСНОЙ ПЕРСИСТЕНЦИИ

Балан О.В.¹, Панова Э.В.¹, Кирьянова К.А.², Таева У.Е.², Тихонович Э.Л.², Шошина Е.А.³

¹ ИБ КарНЦ РАН, Петрозаводск, Россия

² ПетрГУ, Петрозаводск, Россия

³ ЦМБИ КарНЦ РАН, Петрозаводск, Россия

Введение. Эпитранскриптомные модификации — ковалентные, обратимые изменения РНК, регулирующие процессы трансляции, а также стабильность самой молекулы, наряду с эпигенетическими механизмами играют важную роль в регуляции различных биологических процессов. В контексте взаимодействия патоген-хозяин изучение эпитранскриптомных модификаций вызывает значительный интерес, прежде всего в связи с тем, что РНК-содержащие вирусы для репликации используют внутриклеточные механизмы хозяина. Среди более 100 идентифицированных и описанных модификаций наиболее распространенной и значимой является модификация N6-метиладенозина (m6A), динамический уровень которой регулируется метилтрансферазным комплексом, состоящим из метилтрансфераз (METTL) и адаптерных белков (WTAP, HAKAI, VIRMA и др.), обеспечивающих селективное метилирование сайтов. Так, WTAP закрепляет комплекс на хроматине (Scholler et al., 2018), VIRMA опосредует преимущественно метилирование РНК в 3'UTR и вблизи стоп-кодона (Yue et al., 2018), а HAKAI влияет на модификацию m6A в 5'UTR и вокруг стартового кодона (Wang et al., 2021). В ряде исследований было установлено, что подобные эпитранскриптомные модификации способствуют не только репликации вирусов (ВИЧ, вирус гриппа А, респираторно-синцитиальный вирус (RSV), полиомавируса SV40), но и позволяют вирусным РНК избежать распознавания внутриклеточными сенсорами врожденного иммунитета, уходя, таким образом, от противовирусного ответа хозяина. Так, например, метилирование аденозина в положении N6 (m6A) и рекрутирование белков сем. YTHD стабилизируют РНК ВИЧ-1 и продукцию его белка (Kennedy et al., 2016), а нокаут METTL3 снижает репликацию вируса гриппа А за счет снижения уровней как вирусной РНК, так и его белка (Courtney et al., 2017). В отношении новой коронавирусной инфекции влияние модификации m6A и роль адаптерных белков в процессах репликации и персистенции вируса SARS-CoV-2 все еще остаются малоизученными. В некоторых работах отмечается, что репликация вируса может частично находиться под контролем эпигенетических механизмов клеток-хозяина (Atlante et al., 2021; Chlamydas et al., 2021; Beacon et al., 2020; Kianmehr et al., 2021). Показано участие ферментов метилтрансферазного комплекса в первые 48 часов после заражения (Zhang et al., 2021). В исследованиях Лю и коллег продемонстрировано усиление репликации вируса при нокауте *METTL3*, *METTL14* и *YTHDF2* (Liu et al., 2021).

Цель данной работы заключается в изучение роли N6-метиладенозинтрансфераз и некоторых адаптерных белков, ключевых участников эпитранскриптомных модификаций, в развитии персистенции SARS-CoV-2 у пациентов, перенесших COVID-19.

Материалы и методы. Для исследования использовали образцы мононуклеарных клеток (лимфоциты и моноциты), выделенных их периферической венозной крови условно здоровых доноров (до пандемии) и пациентов после перенесенной НКВИ спустя 6 мес. после выздоровления. Материал для исследования получен при содействии кафедры факультетской терапии, фтизиатрии, инфекционных болезней и эпидемиологии Медицинского института ПетрГУ, Республиканской больницы им. Баранова, Центра медико-биологических исследований КарНЦ РАН. Доноры включены в исследование на основании информированного согласия. Критерии исключения для доноров изучаемых групп: перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, беременность и лактация, курение, сахарный диабет, индекс массы тела ≥ 30 кг/м². Из мононуклеаров выделяли тотальную РНК (PureZole, Bio-Rad) и синтезировали комплементарную ДНК (MMLV RT, Евроген), предварительно обработав ДНКазой (Синтол). Количественное определение последовательностей, кодирующих неструктурные белки Nsp3 и Nsp4 вируса SARS-CoV-2, проводили методом капельной цифровой ПЦР — ddPCR (QX200, Bio-Rad, США) с применением QX200 EvaGreen ddPCR supermix. Нуклеотидная последовательность праймеров: Nsp3 прямой 5'-ttacagagcaagggtggtg-3', обратный 5'-agggtgtctgctgtgttcc-3'; Nsp4 прямой 5'-cactcgtgacatagcatctacag-3', обратный 5'-caccattagtgtgcgtaatatcg-3'. На основе данных ddPCR образцы, полученные от доноров после перенесенного COVID-19, были разделены на две группы: «негативные» и «позитивные». В контрольной группе копии гена РНК SARS-CoV-2 не детектировалась. Экспрессию генов, кодирующих N6-метиладенозинтрансферазы (METTL3, METTL14) и адаптерные белки метилтрансферазного комплекса (HAKAI, VIRMA) проводили методом RT-PCR (LightCycler, Roche, Швейцария). Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета программ StatGraphics Centurion. Исследования выполнены на научном оборудовании ЦКП КарНЦ РАН.

Результаты исследования. В ходе исследования было показано статистически значимое повышение уровня экс-

прессии генов, кодирующих метиладенозинтрансферазы 3 и 14 (*METTL2* и *METTL14*) в мононуклеарах пациентов после перенесенной НКВИ по сравнению с контрольной группой (табл. 1). У пациентов, позитивных по SARS-CoV-2 спустя 6 мес. после выздоровления в мононуклеарах сохранялся высокий уровень мРНК *METTL3* и *METTL14*, что может свидетельствовать о вовлечении указанных ферментов в установление латентного состояния вируса. Анализ экспрессии генов, кодирующих адаптерные белки HAKAI и VIRMA, регулирующие метилирование в 5' и 3'-областях РНК соответственно, выявил статистически значимое увеличение уровня транскриптов гена *HAKAI* в мононуклеарах у пациентов, перенесших НКВИ (табл. 1).

Для выявления взаимосвязи между содержанием вирусных частиц SARS-CoV-2 и исследуемыми параметрами был использован корреляционный анализ. Сохранение вирусных частиц SARS-CoV-2 ассоциировано с повышением уровня *METTL3* и *HAKAI*. Согласно значениям рангового коэффициента корреляции Спирмена, имеется тесная положительная связь (по шкале Чеддока) между содержанием вирусных частиц SARS-CoV-2 и уровнем экспрессии гена, кодирующего *METTL3* ($R=0.76$, $p=0.01$). Положительная связь установлена также между количеством вирусных частиц и *HAKAI* ($R=0.54$, $p=0.004$), между уровнем транскриптов *METTL3* и *METTL14* ($R=0.88$, $p=0.0001$). Зависимость признаков статистически значима.

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ N6-МЕТИЛАДЕНОЗИНТРАСФЕРАЗЫ И КЛЮЧЕВЫЕ АДАПТЕРНЫЕ БЕЛКИ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА В МОНОНУКЛЕАРАХ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19.

группа пациентов	METTL3	METTL14	HAKAI	VIRMA
условно здоровые	0,00511 (0,00410; 0,00694)	0,00195 (0,00118; 0,00247)	0,01210 (0,00654; 0,01679)	0,00422 (0,00154; 0,00493)
негативные по SARS-Cov-2	0,00868 (0,00511; 0,01614)	0,00279 (0,00146; 0,00384)	0,01440 (0,00889; 0,01570)	0,00219 (0,00156; 0,00344)
позитивные по SARS-Cov-2	0,01825* (0,01573; 0,02452)	0,00717* (0,00516; 0,00826)	0,04529* (0,01931; 0,05417)	0,00608 (0,00251; 0,00986)

Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха. * — различия достоверны в сравнении с контрольной группой.

Заключение. На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что N6-метиладенозинтрансферазы METTL3, METTL14 и адаптерный белок HAKAI метилтрансферазного комплекса клеток хозяина способствуют сохранению частиц вируса SARS-CoV-2 в течение 6 месяцев после

перенесенного COVID-19. А метилирование вирусной РНК вероятнее всего происходит преимущественно с 5'-конца.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-10102 (<https://rscf.ru/project/23-25-10102>).

Раздел 27. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В НЕВРОЛОГИИ

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА

Шевчук Д. В., Захарова М. Н., Абрамычева Н. Ю., Проценко А. Р.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии»

Актуальность: боковой амиотрофический склероз (БАС) является фатальным быстро прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, возникающим в результате гибели мотонейронов двигательной коры, ствола головного мозга и передних рогов спинного мозга. Заболеваемость БАС в мире, в среднем, составляет 2 случая на 100 000 населения в год, а распространенность, около 5 случаев на 100 000 населения. По данным эпидемиологического исследования (Arthur, K. et al., Nature Communications, 2016) к 2040 году возможно увеличение числа случаев БАС на 69% (с 222 801 в 2015 году до 376 674 в 2040 году). Семейные формы БАС составляют около 5–10%, преимущественно с менделевским аутосомно-доминантным типом наследования. У 90–95% пациентов заболевание носит спорадический характер, но генетические факторы рассматриваются как ключевые даже при отсутствии семейного анамнеза. БАС характеризуется значительной генетической и фенотипической гетерогенностью. За последние десятилетия идентифицировано более 30 генов, являющихся каузальными или повышающих риск развития БАС. Наиболее распространенными мутациями, ассоциированными с развитием БАС, являются экспансия гексануклеотидной последовательности GGGGCC в гене *C9orf72*, мутации в генах супероксиддисмутазы 1 (ген *SOD1*), ДНК/РНК-связывающих белков TAR 43 (ген *TARDBP*) и FUS (ген *FUS*), а также TANK-связывающей киназы 1 (ген *TBK1*). В совокупности они обуславливают около 15–20% всех семейных случаев, а наследуемость семейных форм БАС оценивается примерно в 50%. Наиболее частым патоморфологическим признаком БАС являются цитоплазматические включения в мотонейронах, содержащие TDP-43, белок, кодируемый геном *TARDBP*, которые выявляются более чем в 95% спорадических и семейных форм БАС. Включения белка TDP-43 не являются уникальными для пациентов с мутациями в гене *TARDBP*, они также присутствуют у пациентов с экспансией гексануклеотидной последовательности GGGGCC в гене *C9orf72* или мутациями в гене *TBK1*, за исключением носителей мутаций в генах *SOD1* и *FUS*.

Цель и задачи: описать основные каузальные мутации, ассоциированные с развитием бокового амиотрофического склероза и продемонстрировать на примере мутации в гене *SOD1* многообразие фенотипических проявлений БАС. Провести сравнительный анализ показателей концентрации белка TDP-43 в цереброспинальной жидкости с клинико-генетическими характеристиками.

Материалы и методы: клиническая оценка проводилась по методике стандартного неврологического осмотра, функциональное состояние оценивалось при помощи пересмотренной шкалы ALSFRS-R. Определение экспансии гексануклеотидной последовательности GGGGCC в гене *C9orf72* проводилось методом фрагментного анализа, а мутаций в гене *SOD1* методом прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру. Концентрация белка TDP-43 в цереброспинальной жидкости измерялась методом мультиплексного анализа.

Основные результаты и обсуждение: в 1993 году была обнаружена первая мутация в гене *SOD1*, ассоциированном с развитием симптомов в 20% семейных форм и 1–2% спорадических форм БАС. Мутации в этом гене приводят к развитию каскада патологических реакций в мотонейронах (окислительный стресс, митохондриальная дисфункция, нарушение внутриклеточного протеостаза и агрегация белков).

Нами описан клинический случай ювенильной формы БАС, дебютировавшего у пациентки в возрасте 23 лет и характеризующегося течением по типу подострого полиомиелита и стремительным темпом нарастания инвалидизации по шкале ALSFRS-R. Известно, что большинство мутаций в гене *SOD1* обладают высокой пенетрантностью и характеризуются аутосомно-доминантным типом наследования, однако в ходе генетического анализа у пациентки была выявлена мутация в гене *SOD1*, приводящая к аминокислотной замене p.E134G в гомозиготном состоянии, наследуемая аутосомно-рецессивно. Характер наследования был определен по наличию такой же мутации у матери пробанда в гетерозиготном состоянии, которая являлась здоровым носителем данной мутации. При исследовании уровня белка TDP-43 в цереброспинальной жидкости пациентки отклонений не было выявлено, что соотносится с основными представлениями о нарушении протеостаза при боковом амиотрофическом склерозе, ассоциированном с мутациями в гене *SOD1*, где основным компонентом включений является сам продукт гена с измененной конформацией.

Заключение: несмотря на большое количество проводимых клинических исследований, не существует методов лечения, способных эффективно сдерживать процесс нейродегенерации. Необходимо продолжать поиск генов, ассоциированных с развитием заболевания или повышающих риск его возникновения с целью улучшения понимания патогенетических процессов, лежащих в основе гибели мотонейронов. В 2023 году FDA одобрило препарат

Tofersen, антисмысловый олигонуклеотид, предназначенный для лечения моногенной формы БАС, ассоциированной с мутацией в гене *SOD1*. Продолжаются клинические исследования препарата на основе антисмыслового олигонуклеотида при экспансии гексануклеотидной последовательности GGGGCC в гене *C9orf72*. Необходимость

проведения молекулярно-генетической диагностики не только в случае подозрения на семейный БАС, но также и при спорадических формах обусловлена перспективами разработки терапевтических подходов этого фатального заболевания, а также необходимостью определения четких критериев постановки диагноза.

ГЕНЕТИКА ПЕРВИЧНЫХ ДИСТОНИЙ

Протопопова А.О., Абрамычева Н.Ю., Ключников С.А., Шпилюкова Ю.А., Краснов М.Ю., Евдокимов К.М., Иллариошкин С.Н.

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Введение. Дистония — клинический симптом, характеризующийся нерегулярно и неритмично повторяющимися стереотипными изменениями мышечного тонуса в различных мышечных группах (чаще лица, шеи, конечностей), с развитием произвольных движений или фиксированных поз. На сегодняшний день насчитывается более 30 заболеваний, в клинической картине которых может встретиться дистонический синдром, большинство из них относится к редким заболеваниям нервной системы. Среди всех форм двигательных расстройств дистония уступает место лишь болезни Паркинсона и эссенциальному тремору по распространенности.

Торсионная дистония наряду с болезнью Паркинсона являются генетически гетерогенной группой наследственных патологий, в результате чего дифференциальная диагностика данных заболеваний может быть весьма непростой, особенно при манифестации комплексных «перекрывающихся» фенотипов.

В последние годы ситуация с молекулярным анализом таких нейродегенеративных расстройств значительно изменилась в связи с появлением новейших высокопроизводительных молекулярно-генетических технологий, в первую очередь, массового параллельного секвенирования (Massive Parallel Sequencing, MPS). Использование технологий MPS позволяет оценить генетическую основу конкретных клинических синдромов и уточнить систематизацию данных перекрывающихся форм патологии.

Задачи. Разработка оригинальной диагностической таргетной NGS-панели с применением зондов на платформе Illumina MiSeq для диагностики нейродегенеративных заболеваний, таких как торсионная дистония, типичный и атипичный паркинсонизм. Оценка генетической гетерогенности данных заболеваний в нашей популяции, а также клиничко-генетический анализ пациентов из данной фенотипической группы, имеющих верифицированные мутации в генах.

Материалы и методы. В исследование были включены 96 пациентов с симптоматическими проявлениями по типу паркинсонизма-дистонии старше 18 лет.

Предварительно методами прямой ДНК-диагностики были исключены наиболее распространенные формы болезни Паркинсона, вызванные мажорными мутациями в генах *GBA* (N370S, L444P, T369M), *LRRK2* (G2019S), *SNCA* (A30P), и крупными делециями или дупликациями в генах *PRKN* (1-

12 экзонов), *PINK1* (1-8 экзонов), *SNCA* (2-7 экзонов), *ATP13A2* (2,9,14 и 18 экзонов), *DJ-1* (1,3,5 и 7 экзонов). Также исключены некоторые наиболее частые формы дистоний 1, 5 и 6-го типов, ассоциированные с мажорными мутациями в генах *TOR1A*, *GCH1* и *THAP1*. Образцы геномной ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора для выделения Wizard Genomic DNA Purification Kit («Promega», США). Подготовка библиотеки образцов для дальнейшего таргетного MPS включала в себя фрагментацию геномной ДНК методом ультразвукового воздействия с использованием системы фрагментации ДНК Covaris (FoCuSED-UL), обогащение библиотеки ДНК проводили по технологии SeqCap EZ Library SR с помощью специфических биотинилированных олигонуклеотидных зондов, комплементарных последовательностям кодирующих областей генов, входящих в данную панель. Секвенирование полученных библиотек ДНК проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina), с использованием набора реагентов для секвенирования MiSeq Reagent Kit v3, 150 циклов. Последовательности картировали на геном человека (GRCh38) с использованием программного обеспечения Bowtie2, в среднем 98% прочтений были картированы успешно. Поиск вариантов осуществляли с помощью программы GATK 3.1, а их аннотацию — с помощью ресурса wANNOVAR. При оценке патогенности выявленных вариантов использовали базы данных: Human Gene Mutation Database, dbSNP, OMIM, ClinVar, руководство по интерпретации данных ACMG.

Все положительные находки подтверждались методом капиллярного секвенирования на генетическом анализаторе НАНОФОР 05 (Санкт-Петербург).

Результаты. Всем пациентам проведено панельное секвенирование с помощью разработанной собственной таргетной MPS-панели, состоящей из 59 генов: паркинсонизм — 19 генов, атипичный паркинсонизм — 12 генов, дистония — 23 гена и другие когнитивные нарушения — 5 генов.

По результатам массового параллельного секвенирования были выявлены варианты нуклеотидных замен:

- в генах, ассоциированных с развитием дистонии *TAI1* (DYT3), *TUBB4A* (DYT4), *GCH1* (DYT5), *TH* (DYT14), *THAP1* (DYT6), *PRRT2* (DYT10), *SGCE* (DYT11), *ATP1A3* (DYT12), *PRKRA* (DYT16), *CACNA1B* (DYT23), *ANO3* (DYT24), *GNAL* (DYT25), *COL6A3* (DYT27), *KMT2B* (DYT28), *MECR* (DYT29), *CIZ1*, *KCTD17*, *RELN*,

- в генах, ассоциированных с развитием болезни Паркинсона *PRKN* (PARK2), *PINK1* (PARK6), *LRRK2* (PARK8), *ATP13A2* (PARK9), *GIGYF2* (PARK11), *HTRA2* (PARK13), *PLA2G6* (PARK14), *EIF4G1* (PARK18), *DNAJC6* (PARK19), *SYNJ1* (PARK20), *VPS35* (PARK23), *GBA*, *GRN*, *MAPT*.

У пациентов были выявлены варианты нуклеотидной последовательности, приводящие к прекращению синтеза белка:

- редкие нонсенс-мутации в генах *GIGYF2*, *VPS35*, *THAP1*,
- мутации со сдвигом рамки считывания в генах *PRRT2* (rs587778771), *SYNJ1*,
- изменения канонических нуклеотидов сайта сплайсинга в генах *GCH1*, *GIGYF2*, *VPS35*, *PRKN*,

- вариант, приводящий к изменению в иницирующем кодоне в гене *PRKRA* (rs9406386).

По своему функциональному значению они могут быть интерпретированы как: патогенные варианты, вероятно патогенные, варианты с неопределенной значимостью.

Заключение. На основе новой диагностической таргетной панели были выявлены мутации в исследуемых генах, которые непосредственно коррелируют с развитием двигательных расстройств по типу болезни Паркинсона и дистонии, что подтверждает ее специфичность. Верификация найденных мутаций позволит провести оценку гетерогенности данных заболеваний в нашей популяции.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ КОГНИТИВНОГО СТАТУСА: НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ

Каштанова Д.А.¹, Мамчур А.А.¹, Джуманиязова И.Х.¹, Иванов М.В.¹, Ерема В.В.¹, Зеленова Е.А.¹, Яковчик А.Ю.¹, Гусакова М.С.¹, Румянцева А.М.¹, Терехов М.В.¹, Маткава Л.Р.¹, Акопян А.А.², Стражеско И.Д.², Юдин В.С.¹, Макаров В.В.¹, Краевой С.А.¹, Ткачева О.Н.², Юдин С.М.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России); 119121, Россия, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 1.

² Обособленное структурное подразделение «Российский геронтологический научно-клинический центр» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ОСП РГНКЦ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России); 129226, Россия, Москва, 1-я улица Леонова, д. 16.

Актуальность. Ввиду современной тенденции к старению возраст-ассоциированные заболевания стали истинно глобальной проблемой. Когнитивные нарушения — это необратимое, изменяющее жизнь состояние, которое связано со старением и лишает людей независимости. Поэтому их профилактика должна стать приоритетным направлением, а основные причины этих состояний тщательно изучены.

Цель. Перед исследователями стояла цель изучить молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе когнитивных нарушений у долгожителей. Для этого решены следующие задачи: поиск генетических вариантов, ассоциированных с когнитивными нарушениями долгожителей; интерпретация механизмов, по которым обнаруженные генетические варианты могут приводить к возникновению исследуемого фенотипа; *in silico* моделирование метаболических путей, ассоциированных с когнитивным снижением.

Методы. Для участия в исследовании отобраны 1155 долгожителей в возрасте 90 лет и старше, которым была проведена комплексная гериатрическая оценка и полногеномное секвенирование ДНК. Когнитивный статус долгожителей оценивался с помощью краткой шкалы оценки психического статуса (Mini-Mental State Examination, MMSE). По этому показателю участники разделены на 2 группы: когнитивно сохраненные (MMSE > 24) и когнитивно сниженные (MMSE < 10). Для данных групп проводился полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) с использованием логистической регрессии. Пол и возраст вводились

в качестве ковариат. Дополнительно выборка долгожителей была охарактеризована набором биохимических маркеров крови и данными о выживаемости в течение года, ассоциация которых с наличием различных вариантов гена *APOE* была исследована с помощью логистической и линейной регрессий.

Для продукта гена *APOE* — аполипопротеина Е (АпоЕ) — проведена молекулярнодинамическая симуляция. В качестве стартовой конформации для референсного варианта выбрана структура 2L7B из базы данных Protein Data Bank. Для мутантных вариантов белка соответствующие аминокислотные замены вводились с помощью инструмента «Mutagenesis» программного пакета PyMOL. Молекулярную динамику (МД) проводили с использованием пакета GROMACS 2020.1 и полноатомного силового поля CHARMM27 при температуре 300 К и давлении 1 атм. Растворитель — модель воды TIP4P. Для каждой модели были рассчитаны траектории длительностью 500 нс.

Дополнительно результаты проведенного GWAS были переданы на вход алгоритму PrediXcan. На основании предсказанных алгоритмом сдвигов уровня экспрессии генов в тканях мозга проведён полнотранскриптомный поиск ассоциаций и последующий функциональный анализ с использованием баз данных KEGG и HALLMARK.

Результаты. По результатам GWAS наиболее значимую ассоциацию с когнитивными нарушениями показал вариант rs429358 в гене *APOE* (аллель ε4). Его носители отличаются повышенными значениями общего и ЛПНП-хо-

лестерина, а также более высоким риском смертности в течение 1 года. Для носителей другого аллеля *APOE* ($\epsilon 2$), известного протективного маркера, были показаны обратные зависимости.

По данным молекулярной динамики, оба аллеля *APOE* приводят к изменениям в структуре белка, кодируемого этим геном, по сравнению с референсным вариантом, в особенности в липид-связывающем сайте. Расстояние между N-концевой (аминокислоты 88-104) и C-концевой (аминокислоты 251-266) α -спиралями липид-связывающего сайта увеличивается в обеих изоформах. Для изоформы $\epsilon 2$ характерно сохранение структуры C-концевой α -спирали, в то время как для изоформы $\epsilon 4$ наблюдается расплетание участка из аминокислот 260-266. Для N-концевой α -спирали наблюдается обратная ситуация. Можно предположить, что именно такие структурные различия в липид-связывающем сайте ApoE лежат в основе разного влияния описанных изоформ на клинические показатели носителей соответствующих генотипов.

Однако вариант гена *APOE*, носителем которого является человек, не является единственным фактором, определяющим фенотип заболевания. В связи с этим про-

анализированы функциональные пути, связанные с этими полиморфизмами. Функциональный анализ показал значимую ассоциацию повышенной экспрессии НАДН-дегидрогеназы в коре больших полушарий с наличием когнитивных нарушений у долгожителей. Аналогичная ассоциация показана для метаболических путей, связанных с апоптозом в мозжечке.

Выводы:

- Широко известная ассоциация варианта $\epsilon 4$ гена *APOE* с когнитивными нарушениями воспроизводится даже в генетически однородной группе долгожителей, что подтверждает важную роль данного гена в определении когнитивного статуса.

- Вариант $\epsilon 4$ приводит к дестабилизации структуры липид-связывающего сайта апополипротеина E, что может лежать в основе механизмов патогенеза.

- Помимо липидного обмена, в формирование когнитивных нарушений непосредственно в мозге оказываются вовлечёнными первый комплекс электрон-транспортной цепи митохондрий и апоптотические молекулярные каскады.

Раздел 28. ДРУГОЕ

АКТИВНОСТЬ АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНА В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ БИОМАРКЕР ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Павленко Т.А.¹, Чеснокова Н.Б.¹, Нодель М.Р.², Безнос О.В.¹, Угрюмов М.В.³

¹ ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава РФ, г. Москва

² ФGAOУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава РФ, г. Москва

³ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва

Актуальность. При нейродегенеративных заболеваниях (НДЗ) происходит изменение состава слезной жидкости, связанное с влиянием этих процессов на нервную и гуморальную регуляцию слезных желез [1, 2, 3, 4]. Поэтому слезная жидкость является источником биомаркеров нейродегенеративных процессов в сетчатке и центральной нервной системе (ЦНС), которые могут указывать на наличие нейродегенерации до появления клинических симптомов.

На данный момент актуален поиск биомаркеров в слезной жидкости для выявления ранних симптомов НДЗ, а также оценки адекватности проводимой терапии.

Целью настоящей работы явилось определение активности полифункционального белка α_2 -МГ в слезе пациентов с болезнью Паркинсона (БП).

Материалы и методы исследования. Обследовали 26 пациентов (16 мужчин, 10 женщин, возраст от 57 до 67 лет) с диагнозом БП на 1–2 стадиях по Hoehn-Yahr до начала противопаркинсонической терапии (ФGAOУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Клиника нервных болезней им. А.Я. Кожевникова). Диагноз БП был поставлен в соответствии с клиническими диагностическими критериями Международного общества изучения двигательных расстройств 2015 года (MDS-2015). Все пациенты дали письменное согласие на проведение исследования. Контрольной группой послужили 17 добровольцев (7 мужчин, 10 женщин) без офтальмопатологии и без системных метаболических и неврологических заболеваний, сопоставимые по возрасту с группой больных с ВМД и БП. Среди пациентов и контрольной группы критериями исключения являлись острое воспаление, травма глаза, отсутствие неврологических заболеваний.

Слезную жидкость забирали из обоих глаз утром с помощью стерильной фильтровальной бумаги (шириной 5 мм), которую закладывали за нижнее веко, как при проведении теста Ширмера. Компоненты слезы элюировали физиологическим раствором, в элюате проводили исследование.

Определение активности α_2 -МГ проводили ферментативным методом со специфическим субстратом N-бензоил-DL-аргинин-p-нитроанилидом (БАПНА) [5].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Statistica». Достоверность различий определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни. Разли-

чия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В результате исследования обнаружена активность α_2 -МГ в слезе у пациентов с БП на 50% выше ($7,21 \pm 0,91$ нмоль/мин*мл, $p < 0,03$), чем в контрольной группе ($4,65 \pm 0,25$ нмоль/мин*мл).

У пациентов с БП корреляция активности α_2 -МГ в слезе с тяжестью течения заболевания, гендерных различий и возрастом не обнаружено.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у пациентов с БП происходит повышение активности α_2 -МГ в слезе.

Выявленная повышенная активность α_2 -МГ в слезе у пациентов с БП, вероятно, связана с тем, что патогенез данного заболевания характеризуется нейродегенерацией и нейровоспалением в центральной и периферической нервной системе, затрагивая многие органы и ткани, в том числе глаз, при этом α_2 -МГ активно участвует в регуляции этих системных процессов [6]. Также известно, что α_2 -МГ ингибирует протеолитические ферменты, связывает цитокины, факторы роста, аполипептины и другие белки, которые участвуют в патогенезе НДЗ [7, 8]. Особый интерес представляет нейропротекторная шаперонная активность α_2 -МГ. В этом случае α_2 -МГ служит для стабилизации деформированных белков (β -амилоид и агрегированный α -синуклеин), предотвращая их агрегацию и превращение в нейротоксины [7]. Следует отметить, что α_2 -МГ, помимо нейропротекторных процессов, участвует в нейротоксических процессах, например, подавляя нейропротекторный активность фактора роста нервов [9]. В слезу α_2 -МГ может поступать из роговицы, в клетках которой, в том числе в эпителии происходит его синтез [10], из клеток конъюнктивы, а также из слезных желез. Известно, что состав слезы отражает не только метаболические процессы, протекающие в тканях ее омываемых, но состояние внутренних структур глаза, в том числе сетчатки, что можно объяснить взаимодействием нервных и гуморальных путей регуляции.

Вывод. В целом, преимуществом анализа слезной жидкости является неинвазивность процедуры. Выявленная повышенная активность α_2 -МГ в слезе у пациентов с БП, может рассматриваться как потенциальный биомаркер в комплексной персонализированной диагностике для выявления нейродегенеративного процесса, что позволит более точно определять прогноз и направленность медикаментозной терапии НДЗ.

Литература:

1. Patton N, Aslam T, Macgillivray T, Pattie A, et al. Retinal vascular image analysis as a potential screening tool for cerebrovascular disease: a rationale based on homology between cerebral and retinal microvasculatures., *J Anat.* 2005; 206(4):319-48.
 2. Varma V.R., An Y., Hohman T.J., Seddighi S. et al. Alpha-2 macroglobulin in Alzheimer's disease: a marker of neuronal injury through the RCAN1 pathway. *Mol Psychiatry.* 2017; 22(1):13-23.
 3. Gupta A.K., Pokhriyal R., Khan M.I., Kumar D.R. et al. Cerebrospinal Fluid Proteomics For Identification Of α_2 -Macroglobulin As A Potential Biomarker To Monitor Pharmacological Therapeutic Efficacy In Dopamine Dictated Disease States Of Parkinson's Disease And Schizophrenia. *Neuropsychiatr Dis. Treat.* 2019; 2; 15: 2853-2867.
 4. Bogdanov V., Kim A., Nodel M., Pavlenko T. et al. Pilot Study of Changes in the Level of Catecholamines and the Activity of α -2-Macroglobulin in the Tear Fluid of Patients with Parkinson's Disease and Parkinsonian Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22, 4736.
 5. Chuang WH, Liu PC, Hung CY, Lee KK. Purification, Characterization and molecular cloning of Alpha-2-macroglobulin in *Cobia*, *Rachycentron Canadum*. *Fish and Shellfish Immunology.* 2014;41(2):346-55
 6. Djaldetti, R.; Ziv, I.; Melamed, E. The mystery of motor asymmetry in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006, 5, 796–802.
 7. Cater, J.H.; Wilson, M.R.; Wyatt, A.R. Alpha-2-Macroglobulin, a Hypochlorite-Regulated Chaperone and Immune System Modulator. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019; 2019, 5410657
 8. Rehman, A.A.; Ahsan, H.; Khan, F.H. α -2-Macroglobulin: A physiological guardian. *J. Cell Physiol.* 2013; 228, 1665–16751.
 9. Barcelona, P.F.; Saragovi, H.U. A Pro-Nerve Growth Factor (proNGF) and NGF Binding Protein, α 2-Macroglobulin, Differentially Regulates p75 and TrkA Receptors and Is Relevant to Neurodegeneration Ex Vivo and In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 2015, 35, 3396–3408.
 10. Twining S.S., Fukuchi T., Yue B.Y., Wilson P.M. Alpha 2-macroglobulin is present in and synthesized by the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35(8):3226-33.
- Павленко Татьяна Аркадьевна, с.н.с, начальник отдела патофизиологии и биохимии НМИЦ ГБ им.Гельмгольца, 8(916)390-72-59, tanya1975_inbox.ru

ЧАСТЬ 2. СООТНОШЕНИЕ КЕТОКИСЛОТ А-КЕТОГЛУТАРАТА И А-КЕТОГЛУТАРАМАТА ОТРАЖАЕТ СТЕПЕНЬ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Шурубор Е.И., Кескинов А.А., Юдин В.С., Красников Б.Ф.

ФГБУ "ЦСП" ФМБА России

Введение. Хроническая гепатоэнцефалопатия (ГЭ) — это нейродегенеративное заболевание, вызванное серьезной патологией печени. При высокой степени развития хронической ГЭ смертность может достигать ~70% [1]. Однако своевременная диагностика патологии затруднена отсутствием биомаркеров, способных четко диагностировать заболевание. В плазме крови, тканях печени, почек и мозга крыс с подтвержденным диагнозом хронической ГЭ были рассмотрены активность ферментов глутамин-глутаматного цикла (Глн-Глу): ω -амидазы (ω A) и глутамин трансминазы (ГТА), уровни метаболитов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и промежуточных метаболитов, α -кетоглутарата (α КГ) и α -кетоглутарамата (α КГМ). Показано, что с развитием хронической ГЭ в плазме крови, тканях мозга, почек и печени крыс на фоне снижения активности ω A и ГТА в ~1,1-4 раза, наблюдалось снижение уровня α КГМ в ~1,2-2,5 раза и повышение уровня α КГ в ~1,5-10 раз. Выявлено, что соотношение α КГ и α КГМ в плазме крови крыс отражает тяжесть заболевания печени и может выступать в качестве потенциального биомаркера для диагностики хронической ГЭ.

Цель работы. Выявление потенциальных биомаркеров для определения степени развития хронической ГЭ.

Задачи. Основными задачами исследования были: (а) создание модели крыс с хронической ГЭ; (б) подтверждение степени развития патологии по морфологическому и гистологическому анализу органов крыс; (в) определение специфической ферментативной активности ω A и ГТА; (с) определение уровней метаболитов ЦТК, а также α КГ и α КГМ в плазме крови и органах крыс.

Материалы. В эксперименте продолжительностью 2-22 недели были задействованы белые лабораторные крысы линии Wistar, самцы, с начальным возрастом 2 месяца и весом 140-150 г. Модель крыс с хронической ГЭ была получена в результате приема животными питьевой воды с добавленным гепатотоксином тиаоацетамидом (ТАА) в концентрации 0,4 г/л. Эксперимент был проведен на 26 контрольных и 55 ТАА-индуцированных крысах. Для мониторинга степени развития хронической ГЭ, каждые 2 недели проводили морфологический и гистологический анализ срезов тканей органов крыс, измеряли вес животных, их органов; в образцах плазмы крови, тканях печени, почек и мозга крыс (всего 320 образцов) измеряли специфическую активность ω A и ГТА, уровни метаболитов ЦТК, в том числе α КГ и α КГМ.

Методы. Гистологические препараты органов крыс были получены из парафиновых микросрезов [2]. Ак-

тивность ферментов ω A и ГТА измеряли на 96-луночном планшетном спектрофотометре SpectraMax, абсорбцию измеряли в течение 5 мин при длинах волн 430 нм для ω A и 322 нм для ГТА согласно опубликованному протоколу [3]. Для анализа метаболитов ЦТК, α КГ и α КГМ использовали разработанный ранее метод ВЭЖХ-УФ анализа [4,5]. Статистическая обработка данных была выполнена с помощью процедуры Бенджамини–Хохберга, тестов Бартлетта и Шапиро–Уилка.

Основные результаты. Развитие хронической ГЭ было подтверждено результатами анализа гистологических препаратов органов крыс. Источником образования α КГ, кроме работы ЦТК, является переаминирование Глн в результате функционирования Глн-Глу цикла (путь глутаминазы II). Здесь, при участии ГТА образуется α КГМ, который в присутствии ω A гидролизуется до α КГ и амиака. Анализ полученных данных по распределению

активности ферментов, уровней метаболитов ЦТК, α КГ и α КГМ в контрольных и ТАА-индуцированных группах крыс выявил ряд закономерностей. Так, по мере развития хронической ГЭ, во всех образцах крыс было отмечено ингибирование обоих ферментов Глн-Глу цикла, возрастание уровней α КГ и снижение уровней α КГМ. Выраженность трендов была обусловлена местом локализации метаболитов (плазма крови, ткани печени, почек и мозга). Специфическая активность ω A и ГТА при развитии хронической ГЭ в тканях мозга и в плазме крови крыс снижалась незначительно, а в тканях почек и печени крыс, значительно, в 2-4 раза (Табл. 1). Однако даже относительно небольшое снижение специфической активности ω A и ГТА в плазме крови ТАА-индуцированных крыс сопровождалось заметным увеличением уровней α КГ и уменьшением уровней α КГМ относительно контрольных значений (Табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ω A, ГТА, УРОВНЕЙ α КГ И α КГМ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ТКАНЯХ ОРГАНОВ КОНТРОЛЬНЫХ И ТАА-ИНДУЦИРОВАННЫХ КРЫС.

	Плазма крови		Печень		Почки		Мозг	
	Контроль	ГЭ	Контроль	ГЭ	Контроль	ГЭ	Контроль	ГЭ
ГТА ¹	0,0029 ± 0,0014	0,0032 ± 0,0023	0,0044 ± 0,0002	0,0013 ± 0,0002	0,0118 ± 0,0015	0,0046 ± 0,0013	0,0020 ± 0,0002	0,0018 ± 0,0002
ω A ¹	0,0154 ± 0,0035	0,0145 ± 0,0066	0,0672 ± 0,0048	0,0241 ± 0,0060	0,0729 ± 0,0126	0,0433 ± 0,0123	0,0045 ± 0,0015	0,0044 ± 0,0017
α КГ ²	2,80 ± 2,56	19,07 ± 7,09	0,001 ± 0,0001	0,01 ± 0,0001	0,22 ± 0,36	0,40 ± 0,45	0,0054 ± 0,0063	0,0074 ± 0,0065
α КГМ ²	21,2 ± 6,37	9,70 ± 4,51	0,80 ± 0,20	0,71 ± 0,15	0,29 ± 0,075	0,12 ± 0,037	0,30 ± 0,22	0,23 ± 0,053
α КГ/ α КГМ ³	0,13	1,97	0,001	0,014	0,76	3,33	0,016	0,030

¹ нмоль/мг/мин

² в образцах плазмы крови — μ M; в тканях печени, почек и мозга — нмоль/мг сырой ткани

³ отношение уровней α КГ/ α КГМ в контрольных и ГЭ образцах тканей крыс

Таким образом, соотношение α КГ/ α КГМ, отражающее дисбаланс Глн-Глу цикла и метаболитов ЦТК, в плазме крови крыс с хронической ГЭ увеличивалось более, чем в 15 раз, в печени в ~14 раз, в тканях почек в ~4,5 раза и в тканях мозга в ~2 раза. Следует отметить, что соотношение α КГ/ α КГМ, рассчитанное для плазмы крови крыс с хронической ГЭ, было сопоставимо со значением α КГ/ α КГМ, рассчитанным для печени.

Заключение. Выдвинуто предположение, что соотношение α КГ/ α КГМ в плазме крови крыс с хронической ГЭ может выступать в качестве потенциального биомаркера для оценки степени заболевания печени. Для проверки возможности использования данного биомаркера при проведении широкомасштабных эпидемиологических исследований, необходимо проведение соответствующих клинических испытаний на образцах плазмы крови человека.

Литература:

1. Wong RJ, Gish RG, Ahmed A. Hepatic encephalopathy is associated with significantly increased mortality among

patients awaiting liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2014; 20:1454–1461.

2. 101 shag na puti k uspekhu v gistologii. Leica Microsystems Vetzlar, Germany. 2012; 136 s. Russian.

3. Shurubor YI, Rogozhin AE, Isakova EP, Deryabina YI, Krasnikov BF. Residual Amino Acid Imbalance in Rats during Recovery from Acute Thioacetamide-Induced Hepatic Encephalopathy Indicates Incomplete Healing. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(4):3647.

4. Shurubor YI, Cooper AJ, Isakova EP, Deryabina YI, Beal MF, Krasnikov BF. HPLC determination of α -ketoglutaramate [5-amino-2,5-dioxopentanoate] in biological samples. *Anal Biochem*. 2016; 494:52–54.

5. Shurubor YI, Cooper AJ, Isakova EP, Deryabina YI, Beal MF, Krasnikov BF. Simultaneous determination of tricarboxylic acid cycle metabolites by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Anal Biochem*. 2016; 503:8–10.

PART 2. RATIO OF KETOACIDS A-KETOGLUTARATE AND A-KETOGLUTARAMATE REFLECTS THE DEGREE OF DEVELOPMENT OF CHRONIC HEPATOENCEPHALOPATHY

Shurubor E.I., Keskinov A.A., Yudin V.S., Krasnikov B.F.

Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia

Introduction. Chronic hepatic encephalopathy (HE) is a neurodegenerative disease caused by severe liver disease. With a high degree of development of HE, mortality can reach 70% [1], however, the diagnosis of HE is difficult due to the lack of biomarkers that can clearly diagnose the disease. In blood plasma, tissues of the liver, kidneys and brain of rats with a confirmed diagnosis of chronic HE, the activity of enzymes of the glutamine-glutamate cycle (Gln-Glu): ω -amidase (ω A) and glutamine transaminase (GTK), levels of metabolites of the tricarboxylic acid cycle (TCA) and intermediate metabolites, α -ketoglutarate (α KG) and α -ketoglutaramate (α KGM) have been considered. It has been shown that with the development of chronic HE in the blood plasma, brain tissues, kidneys and liver of rats against the background of a decrease in the activity of ω A and GTK by ~ 1.1 -4 times, a decrease in the level of α KGM by ~ 1.2 -2.5 times and an increase in the level α KG by ~ 1.5 -10 times were observed. It was found that the ratio of α KG and α KGM in the blood plasma of rats reflects the severity of liver disease and can act as a potential biomarker for diagnosing chronic HE.

The purpose of the work: Identification of potential biomarkers for determining the degree of chronic HE development.

Objectives. The main objectives of the study were: (a) creation of a model of rats with chronic HE, (b) confirmation of the degree of development of chronic HE by morphological and histological analysis of rat organs, (c) determination of the ω A and GTK specific enzymatic activity, (d) determination of the TCA metabolites levels, as well as α KG and α KGM in blood plasma and organs of rats.

Materials. In an experiment lasting 2-22 weeks, white laboratory rats of the Wistar line, males, initial age 2 months, weight 140-150 g were used. The rat model with chronic HE was obtained by ingesting drinking water supplemented with the hepatotoxicant thioacetamide (TAA) at a concentration of 0.4 g/l. A total of 26 control and 55 TAA-induced rats participated in the experiment. To monitor the degree of development of chronic HE, every 2 weeks, a morphological and histologi-

cal analysis of tissue sections of rat organs was performed, the weight of animals and their organs was measured, in blood plasma samples, tissues of the liver, kidneys and brain of rats (320 samples in total), the specific activity of ω A and GTK, levels of TCA metabolites, α KG and α KGM were measured.

Methods. Histological preparations of rat organs were obtained from paraffin microsections [2]. The activity of ω A and GTK enzymes was measured on a SpectraMax 96-well plate reader spectrophotometer, absorbance was measured for 5 min at wavelengths of 430 nm for ω A and 322 nm for GTK according to the published protocol [3]. To analyze TCA metabolites α KG and α KGM we used the HPLC-UV analysis method developed earlier [4, 5]. Statistical data processing was performed using the Benjamini-Hochberg procedure, Bartlett and Shapiro-Wilk tests.

Main results. Confirmation of the chronic HE development was obtained as a result of the analysis of histological preparations of rat organs. The source of α KG formation, in addition to the TCA, is the transamination of Gln as a result of the functioning of the Gln-Glu cycle (the glutaminase II pathway). Then, with the participation of GTK, α KGM is formed, which in the presence of ω A is hydrolyzed to α KG and ammonia. Analysis of the obtained data on the distribution of enzyme activity, levels of metabolites of TCA, α KG and α KGM in control and TAA-induced groups of rats revealed certain patterns. Thus, as chronic HE developed, inhibition of both enzymes of the Gln-Glu cycle, an increase in α KG levels and a decrease in α KGM levels were noted in all rat samples. The severity of the trends was due to the location of the metabolites (blood plasma, liver, kidney and brain tissues). The ω A and GTK specific activity during the development of chronic HE in the brain tissues and in the blood plasma of rats decreased slightly, while in the tissues of the kidneys and liver of rats, significantly, by 2-4 times (Table 1). However, even a relatively small decrease in the specific activity of ω A and GTK in the blood plasma of rats with chronic HE was accompanied by a marked increase in α KG levels and a decrease in α KGM levels relative to control values (Table 1).

TABLE 1. SPECIFIC ENZYMATIC ACTIVITY OF ω A AND GTA AND LEVELS OF AKG AND AKGM IN BLOOD PLASMA AND ORGAN TISSUES OF CONTROL AND TAA-INDUCED RATS.

	Blood plasma		Liver		Kidneys		Brain	
	Control	HE	Control	HE	Control	HE	Control	HE
GTK ¹	0.0029 ± 0.0014	0.0032 ± 0.0023	0.0044 ± 0.0002	0.0013 ± 0.0002	0.0118 ± 0.0015	0.0046 ± 0.0013	0.0020 ± 0.0002	0.0018 ± 0.0002
ω A ¹	0.0154 ± 0.0035	0.0145 ± 0.0066	0.0672 ± 0.0048	0.0241 ± 0.0060	0.0729 ± 0.0126	0.0433 ± 0.0123	0.0045 ± 0.0015	0.0044 ± 0.0017
α KG ²	2.80 ± 2.56	19.07 ± 7.09	0.001 ± 0.0001	0.01 ± 0.0001	0.22 ± 0.36	0.40 ± 0.45	0.0054 ± 0.0063	0.0074 ± 0.0065

αKG^2	21.2 ± 6.37	9.70 ± 4.51	0.80 ± 0.20	0.71 ± 0.15	0.29 ± 0.075	0.12 ± 0.037	0.30 ± 0.22	0.23 ± 0.053
$\alpha\text{KG}/\alpha\text{KGM}^3$	0.13	1.97	0.001	0.014	0.76	3.33	0.016	0.030

¹ nmol/mg/min

² in blood plasma samples — μM ; in the tissues of the liver, kidneys and brain — nmol/mg of wet tissue

³ ratio of $\alpha\text{KG}/\alpha\text{KGM}$ levels in control and HE rat tissue samples

Thus, the ratio of both $\alpha\text{KG}/\alpha\text{KGM}$ metabolites, reflecting the imbalance of the Gln-Glu cycle and TCA, increased more than 15 times in the blood plasma of rats with chronic HE, ~14 times in the liver, and ~4.5 times in the kidney tissues and in brain tissues by ~2 times. It should be noted that the $\alpha\text{KG}/\alpha\text{KGM}$ ratio calculated for the blood plasma of rats with chronic HE was comparable to the $\alpha\text{KG}/\alpha\text{KGM}$ value calculated for the liver.

Conclusion. It has been suggested that the ratio of $\alpha\text{KG}/\alpha\text{KGM}$ calculated for the blood plasma of rats with chronic HE can act as a potential biomarker for assessing the degree of liver disease. To test the possibility of using this biomarker in large-scale epidemiological studies, it is necessary to conduct appropriate clinical trials on samples of human blood plasma.

References:

1. Wong RJ, Gish RG, Ahmed A. Hepatic encephalopathy is associated with significantly increased mortality among

patients awaiting liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2014; 20:1454–1461.

2. 101 shag na puti k uspekhu v gistologii. Leica Microsystems Vetzlar, Germany. 2012; 136 s. Russian.

3. Shurubor YI, Rogozhin AE, Isakova EP, Deryabina YI, Krasnikov BF. Residual Amino Acid Imbalance in Rats during Recovery from Acute Thioacetamide-Induced Hepatic Encephalopathy Indicates Incomplete Healing. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(4):3647.

4. Shurubor YI, Cooper AJ, Isakova EP, Deryabina YI, Beal MF, Krasnikov BF. HPLC determination of α -ketoglutarate [5-amino-2,5-dioxopentanoate] in biological samples. *Anal Biochem*. 2016; 494:52–54.

5. Shurubor YI, Cooper AJ, Isakova EP, Deryabina YI, Beal MF, Krasnikov BF. Simultaneous determination of tricarboxylic acid cycle metabolites by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Anal Biochem*. 2016; 503:8–10.

ЭКСПРЕССИЯ NF- κ B1/RELA В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С ЛЕГКОЙ И ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Алексеева А.С., Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова А.Л.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ЧелГУ»), Челябинск, Россия

Введение. Расстройства аутистического спектра (РАС) — это нарушения нейроразвития, патогенез которых неясен и включает сложное взаимодействие генетических, иммунных и экологических факторов. Современные исследования показывают, что воспалительные и апоптотические механизмы в центральной нервной системе могут вносить значимый вклад в патогенез нервно-психических расстройств, включая аутизм [1]. На клеточном уровне ключевую роль в воспалительных реакциях, иммунных функциях, выживании клеток и предотвращении клеточного апоптоза играет семейство эволюционно консервативных факторов транскрипции — семейство ядерного фактора — каппа В (NF- κ B). У млекопитающих в настоящее время известно пять членов семейства: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB и c-Rel, образующих массив гомо- и гетеродимеров, которые связываются с ДНК для индукции транскрипции различных целевых генов. Несмотря на существование множества димеров NF- κ B, наиболее распространенным из них является гетеродимер субъединицы RelA (p65), связанный либо с субъединицей NF- κ B1 (p50), либо с субъединицей NF- κ B2 (p52), который контролирует экспрессию большинства ге-

нов, регулируемых NF- κ B, в том числе, генов, вовлеченных в воспалительные реакции [2].

Ранее нами было показано, что у детей с тяжелой формой РАС повышены плазменные уровни некоторых провоспалительных цитокинов (IL-6 и IFN γ) [3], что может быть обусловлено нарушением путей регуляции воспаления в клетках иммунной системы. Анализ уровней экспрессии мономеров NF- κ B: NF- κ B1 (p50) и RelA (p65), в лейкоцитах периферической крови детей с РАС может способствовать пониманию механизмов иммунной дисфункции при аутизме.

Целью данного исследования стала оценка уровней экспрессии мономеров NF κ B: p50 и p65, в лейкоцитах периферической крови детей с легкой и тяжелой формами РАС.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 126 детей в возрасте от 3 до 13 лет, соотношение мальчиков:девочек — 4:1. В работу был включен 81 ребенок с РАС, и 45 детей с нормотипичным нейроразвитием (ТРД). Все дети с РАС имели диагноз аутизм в соответствии с МКБ-10, выставленный психиатрами, и были разделены на 2 группы с помощью рейтинговой шкалы детского аутизма (Childhood Autism Rating Scale, CARS): 51 человек с

легкой или умеренной формой аутизма и 30 лиц с тяжелым аутизмом.

Экспрессию мономеров NFκB p50 и p65, участвующих в передаче воспалительного сигнала, определяли в лейкоцитах периферической крови методом ПЦР с обратной транскрипцией. кДНК синтезировали из общей РНК с применением набора реагентов «ОТ-1» для обратной транскрипции («Синтол», Москва). ПЦР в реальном времени проводили на наборах реагентов для количественной ПЦР с SYBRGreen («Синтол», Москва), с использованием следующих последовательностей праймеров: NFκB p50: forward 5'-GTGGTGCCTCACTGCTAACT-3'; reverse 5'-GGATGCACCTTCAGCTTCTGT-3'; NFκB p65: forward 5'-GCACAGATACCACCAAGACC-3'; reverse 5'-TCAGCCTCATAGAAGCCATC-3'.

Для сравнения выборок применяли однофакторный дисперсионный анализ с попарными сравнениями по Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты. Было установлено, что у детей с тяжелой формой РАС в лейкоцитах периферической крови значительно снижена экспрессия субъединицы p65 NF-κB по сравнению со здоровым контролем ($P=0,013$). В ходе работы нами не было обнаружено статистически значимых различий в

уровнях экспрессии субъединицы p50 NF-κB между исследуемыми группами.

Заключение. Таким образом, снижение уровня экспрессии одного из главных мономеров NFκB — p65 в лейкоцитах периферической крови детей с тяжелой формой РАС, вероятно, может говорить о снижении передачи воспалительного сигнала за счет подавления активности NFκB. Такое явление может носить адаптационный характер и позволяет поддерживать системное хроническое воспаление в данной группе детей на низком уровне.

Литература.

1. Chen H-R, Chen C-W, Mandhani N, Short-Miller JC, Smucker MR, Sun YY, et al. Monocytic Infiltrates Contribute to Autistic-like Behaviors in a Two-Hit Model of Neurodevelopmental Defects. *J Neurosci.* 2020; 40(49): 9386-9400.

2. Liao X, Li Y. Nuclear Factor Kappa B in Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Pharmacol Res.* 2020; 159: 104918.

3. Филиппова Ю.Ю., Девятова Е.В., Алексеева А.С., Бурмистрова А.Л. Цитокины и нейротрофические факторы в оценке степени тяжести аутизма у детей. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2022; 67(11): 647-651.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ: ПРОБЛЕМА ПОДБОРА ДОНОРОВ И ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Беспярых Ю.А.^{1,2,3}, Серёгин Г.З.⁴, Шанский Я.Д.¹, Комарова А.В.^{1,3}, Кузьменко Л.В.^{1,3}, Олехнович Е.И.¹, Климина К.М.¹, Жгун Е.С.¹, Прохорова Н.Д.¹, Бронин Г.О.⁴, Господарик А.В.¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России (ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина), Москва, Россия

² Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья имени Н.А. Семашко, Москва, Россия

³ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. На сегодняшний день как в мире, так и в России, растет тенденция использования новой, многообещающей медицинской технологии — трансплантации фекальной микробиоты (далее, ТФМ) — метод, который основан на введении здорового фекального материала донора реципиенту с целью восстановления нарушенной микробиоты кишечника [1]. ТФМ стала высокоэффективным методом лечения (бактериотерапией) при рецидивирующей инфекции *Clostridioides difficile*. В 2022 году FDA впервые зарегистрирован препарат фекальной микробиоты Rebyota (ректальное введение), а в мае 2023 года одобрен пероральный препарат Vowst.

Успешность метода использования ТФМ в лечении заболеваний, связанных с изменением нормальной микробиоты кишечника [2,3], неразрывно связана с необходимостью проведения всестороннего, строгого скрининга населения для отбора потенциальных доноров.

Цель исследования заключалась в создании унифицированного оптимального алгоритма подбора донора фекальной микробиоты, включающего лабораторное исследование биоматериала; отработка протоколов пробоподготовки трансплантата и проведение непосредственно процедуры ТФМ для профилактики и терапии различных желудочно-кишечных осложнений у пациентов от 1 до 18 лет после аллогенной трансплантации костного мозга методом трансплантации фекальной микробиоты.

Материалы и методы. Для создания банка доноров фекальной микробиоты в исследование включено 57 потенциально здоровых добровольца. Всем проведены анализы согласно предложенным алгоритмам (анализ крови, мочи, кала). Проведен анализ кала на определение бактериального состава, содержание желчных и жирных кислот, а также секвенирование. Для установления вероятного минимального возраста формирования носительства и путей передачи генов резистентности (*mef* и *ermB*) в исследование включены образцы кала ($n=12$) и грудного молока ($n=6$) из группы добровольцев «мать-дитя». Пробоподготовка биоматериала для трансплантации проводилась по собственной разработанной методике.

В качестве реципиентов ТФМ в исследование включено 14 пациентов (от 1.6 до 17 лет) после алло-ТГСК с кишечными инфекциями. Всем пациентам проведена

ТФМ следующими спо соба́ми: введение жидкой фракции (n=20); прием пероральных капсул лиофилизированного материала (n=3). В кале пациентов на всех этапах, как до проведения ТФМ, так и после трансплантации, оценивали наличие патогенной кишечной флоры, включая вирусы; проводили качественный и количественный состав короткоцепочечных жирных кислот и желчных кислот.

Дополнительно проведено метагеномное секвенирование образцов кала доноров ТФМ и реципиента до и после процедуры.

Результаты. Согласно данным анкетирования и результатам клинических исследований (общий и биохимический анализ крови) 23/57 добровольца включены для дальнейшего исследования. Анализ бактериологического состава ФМ показал, что соответствуют нормам только 4/23 добровольцев. Показана высокая частота выявления генов устойчивости *mef* — 97,8% и *ermB* — 93,5%. В группе «мать–дитя» ген *mef* обнаружен во всех образцах кала и гр удного молока [4].

Разработан способ получения лиофильно высушенного препарата фекалий человека для трансплантации фекальной микробиоты (заявка на изобретение №2021136278)

При использовании ТФМ клинический эффект достигнут у 13 из 14 пациентов. У большинства пациентов нежелательные явления сводились к тошноте в день процедуры, метеоризму в первые 24–72 часа от процедуры. После двух процедур нивелирован кишечный синдром, анализы на РНК астровируса; клостридиальные токсины и энтероинвазивную *E. coli* отрицательные. Увеличилось содержание холевой и дезоксихолевой кислот в кале, а также их конъюгатов с глицином и таурином; увеличилось содержание уксусной кислоты с одновременным снижением уровня пропионовой кислоты, что указывает на восстановление функционального потенциала кишечной микробиоты.

Результаты секвенирования подтверждают изменение микробного пейзажа реципиента после проведенной процедуры ТФМ. Однако, стоит отметить, что категория пациентов, включенных в исследование, обла-

дала нехарактерным кишечным составом микробиоты. У пациентов детектированы в кале *St. epidermidis*, *St. oralis*, *Veillonella parvula*. После процедуры ТФМ данные микроорганизмы не выявлены.

Заключение. Анализ здоровых добровольцев — потенциальных доноров ФМ, показал очень низкий процент соответствия нормам по различным анализируемым критериям. Это может свидетельствовать о проблеме со здоровьем населения в целом. Ввиду того, что гены *mef* и *ermB* обнаружены не только у взрослого населения, но и у младенцев нами было выдвинуто предположение, о допустимости использования трансплантата (кала), содержащего данные гены.

Трансплантация фекальной микробиоты способствует восстановлению нормальной микрофлоры кишечника, устранению токсинов у реципиентов алло-ТГСК, что подтверждается показателями метаболитов в том числе, и может быть использована у реципиентов алло-ТГСК с течением инфекций, рефрактерных к конвенциональному лечению

Список литературы:

1. Щербаков П.Л., Белова Н.Д., Генерозов Э.В., Жгун Е.С., Иванова О.И., Ильина Е.Н., Калачнюк Т.Н., Павленко А.В., Подгорский В.В., Манолов А.И., Маторин Р.И., Олехнович Е.И., Щербакова М.Ю. Применение фекальной трансплантации в лечении заболеваний пищеварительного тракта (первый клинический опыт) // Доктор.Ру. 2019. № 3 (158). С. 40–46.
2. Wilson BC, Vatanen T, Cutfield WS, O'Sullivan JM. The Super-Donor Phenomenon in Fecal Microbiota Transplantation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 Jan 21;9:2.
3. Chen J, Zaman A, Ramakrishna B, Olesen SW. Stool Banking for Fecal Microbiota Transplantation: Methods and Operations at a Large Stool Bank. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Apr 15;11:622949.
4. Господарик, А. В., Улаханова, Л. А., Есиев, С. С., Полякова, Е. В., Шанский, Я. Д., Беспятых, Ю. А. Роль генетических маркеров лекарственной устойчивости *mef* и *ermB* при подборе доноров фекальной микробиоты // Вестник РГМУ. 2022. №6. С. 5–12.

ОЦЕНКА КЛИНИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ КОРРЕЛЯЦИЙ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН-ЗАВИСИМЫХ АНТИОКСИДАНТОВ С УРОВНЕМ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ДЕПРЕССИВНЫМ СИНДРОМОМ

Васильева Е.Ф., Савушкина О. К., Прохорова Т.А., Терешкина Е.Б.

ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» (НЦПЗ), Москва, Россия

Введение. Показана роль различных ферментативных антиоксидантов, в частности, глутатион-зависимой антиоксидантной системы в эритроцитах и моноцитах (М) крови у пациентов с различными соматическими заболеваниями. Есть сообщения о том, что в условиях системной патологии продуцируемый активированными М

провоспалительный цитокин ИЛ-6 способен стимулировать высвобождение активных форм кислорода из М и вызывать окислительное повреждение других клеток. Было высказано предположение, что высокий уровень ИЛ-6, характеризующий высокий уровень провоспалительной активности М (ПАМ) может быть причиной истощения

антиоксидантов в плазме крови. Известно об изменении активности ферментов глутатионового обмена в эритроцитах крови у больных с психическими заболеваниями. Однако до сих пор не установлена связь активности глутатион-зависимых антиоксидантных ферментов, определяемой в этих клетках, с уровнем ПАМ у пациентов с психическими расстройствами.

Целью настоящего исследования являлась оценка клинико-биологических корреляций активности ферментов антиоксидантной системы глутатиона в эритроцитах крови с уровнем ПАМ у больных с депрессивным синдромом (ДС).

Материал и методы. С помощью клинических, психометрических, иммунологических и биохимических методов обследовано 62 женщины с ДС в возрасте от 15 до 56 лет (средний возраст $29,0 \pm 1,4$ года) до и после применения комбинированной терапии антидепрессантами и антипсихотиками. В качестве контроля обследовано 23 здоровых женщины соответствующего возраста без психических и неврологических заболеваний.

Клиническую оценку психопатологического состояния больных проводили с помощью психометрических методов с использованием шкалы позитивных и негативных синдромов PANSS (The Positive and Negative Syndrome Scale). Уровень депрессивных расстройств оценивали с помощью шкалы Гамильтона, разработанной для оценки депрессии (HDRS, Hamilton Rating Scale for Depression). В качестве критериев оценки эффективности терапии рассматривали снижение после лечения среднего суммарного балла по шкале PANSS (PANSS_tot) на 20% и — по шкале HDRS (HDRS_tot) на 80%.

Биологические исследования проводили на М и эритроцитах, выделенных из периферической венозной крови больных и лиц контрольной группы.

Иммунологические исследования включали выделение чистой популяции М с использованием набора EasySep™ Human CD14 Positive Selection Kit II (STEMCELL Technologies Canada Inc.). Оценка ПАМ проводили с помощью разработанного нами метода подсчета количества больших моноцитов с диаметром от 12,5 до 15 мкм и общего количества моноцитов с диаметром от 9 до 15 мкм на многофункциональном счетчике и анализаторе клеток Multisizer MS-4 (Beckman Coulter, USA). Результат рассчитывали как отношение в процентах количества «больших моноцитов» к их общему количеству и представляли в виде индекса провоспалительной активности М (ИПАМ).

Биохимические исследования включали оценку активности ферментов глутатионового метаболизма в эритроцитах: ГСТ (глутатион- S-трансферазы) и ГР (глутатионредуктазы). Активность ферментов определяли спектрофотометрическими кинетическими методами с использованием спектрофотометра DU-800 (Beckman Coulter, USA).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы STATISTICA10.0 (StatSoft) с использованием t-критерия Стьюдента для зависимых и независимых переменных. Для выявления связей между рассматриваемыми показателями проводили оценку линейной регрессии с использованием r-критерия Спир-

мана (Spearman r). Оценка статистической значимости связи между изучаемыми показателями определяли по двухстороннему точному критерию Фишера (Fisher Exact Test 2-tailed). Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В группе больных с ДС до лечения выявлен высокий уровень ПАМ по сравнению с контролем ($p < 0,01$). После лечения отмечена существенная редукция психопатологических расстройств, оцененных по PANSS_tot, HDRS_tot ($p < 0,001$, $p < 0,01$) и значительно выраженное снижение уровня ПАМ ($p < 0,05$). Достоверного изменения активности ГСТ и ГР в группе больных в ходе лечения не обнаружено.

Индивидуальный анализ в общей группе больных с ДС до лечения выявил значительные колебания значений исследуемых показателей. Для получения выборок больных с более равномерным их распределением был проведен кластерный анализ, основанный на разделении всех пациентов по медианному значению ИПАМ на два кластера с исходно низким и высоким (до начала лечения) его уровнем и со статистически выраженным различием между кластерами ($p < 0,001$). Полученные результаты показали, что до лечения в кластере больных с исходно высоким уровнем ПАМ, его значение было значительно выше, чем в контроле. При этом активности ГСТ и ГР были снижены, но достоверно не отличались от контроля. Напротив, в кластере больных с исходно низким уровнем ПАМ активность ГСТ было значительно выше по сравнению с контролем ($p < 0,05$), а активность ГР значительно превышала ее уровень в кластере с исходно высоким уровнем ПАМ ($p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о существовании реципрокной связи между уровнем ПАМ и значениями показателей глутатионового метаболизма. Эта зависимость была подтверждена по Хи-квадрат тесту ($p < 0,05$) и по двухстороннему точному критерию Фишера ($p < 0,05$).

Анализ связи изучаемых показателей с выраженностью психопатологических расстройств проведенный с помощью линейной регрессии, выявил до лечения в группе больных респондеров по PANSS_tot и по HDRS_tot отрицательные корреляционные зависимости между значениями ИПАМ и ГР ($r = -0,57$, $p < 0,05$ и $r = -0,68$, $p < 0,01$, соответственно) и в группе больных респондеров по HDRS_tot — отрицательные корреляции между значениями ИПАМ и ГСТ ($r = -0,47$, $p < 0,05$). Обнаруженные зависимости были подтверждены по Хи-квадрат тесту ($p < 0,01$) и по двухстороннему точному критерию Фишера ($p < 0,01$). В группе больных нонреспондеров по HDRS_tot и по PANSS_tot подобные корреляции не выявлялись.

Заключение. Выявленные клинико-биологические корреляции согласуются с данными литературы и могут свидетельствовать о существовании обратной связи между снижением активности глутатион-зависимых ферментов в эритроцитах и повышенным уровнем ПАМ у пациентов с ДС, который может быть причиной истощения ферментов глутатионового метаболизма в эритроцитах крови у больных с этим психическим расстройством. Полученные результаты позволяют предположить возможное участие выявленных молекулярных механизмов в этиологии и патогенезе депрессивных расстройств.

ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К *TREPONEMA PALLIDUM*: ОПТИМИЗАЦИЯ ПОСТНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ИССЛЕДОВАНИЯ

Фомина О.В., Болотина Е.В.

ГБУЗ «Областной кожно-венерологический диспансер №4», Магнитогорск, Россия

Актуальность. ГБУЗ «ОКВД №4» оказывает специализированную медицинскую помощь жителям Магнитогорска и прилегающих территорий. Приоритетной задачей является профилактика, диагностика и лечение сифилиса — социально-значимого инфекционного заболевания. Важнейшее место в системе контроля за данной инфекцией занимает лабораторная диагностика, львиную долю в которой составляют серологические методы — выявление антител к возбудителю (*T. pallidum*) в сыворотке крови.

Цель. Выбор оптимального способа оценки уровня антител.

Методы. В соответствии с Приказом МЗ РФ №87 от 26.03.2001 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса» в клинико-диагностической лаборатории (КДЛ) диспансера выполняется комплекс серологических реакций (КСР) — микрореакция преципитации с кардиолипиновым антигеном (МРП), иммуноферментный анализ (ИФА), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА).

Материалы. «Антиген кардиолипиновый» — набор реагентов для реакции микропреципитации, АО «НПО «Микроген», Пермь; «РекомбигБест антипаллидум — суммарные антитела» — набор реагентов для иммуноферментного выявления суммарных антител к *T. pallidum*, АО «ВЕКТОР-БЕСТ», Новосибирск; «Сифилис-РПГА-тест» — набор реагентов для определения антител к *T. pallidum* в реакции пассивной гемагглютинации, ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск.

Основные результаты. С сентября 2022г. по июнь 2023г. в КДЛ диспансера КСР выполнен для 609 пациентов, обратившихся к врачу-венерологу поликлинического отделения.

По умолчанию, результаты исследования методом ИФА подразделяются на положительные и отрицательные относительно уровня критической оптической плотности

(ОПкрит). В то же время существуют общие требования, соблюдение которых способно снизить вероятность получения неправильных результатов анализа. Выделяется «серая зона» в пределах +/- 20% от ОПкрит, внутри которой результаты трактуются как сомнительные (1).

Таким образом, было получено 206 положительных, 16 сомнительных и 387 отрицательных результатов выявления антител к *T. pallidum* методом ИФА.

Для наблюдения за динамикой инфекционного процесса применяется «оцифровка» уровня антител. Классический способ — титрование антител — подразумевает восемь последовательных 2-кратных разведений образца, что значительно увеличивает затраты расходных материалов и рабочего времени. Поэтому, в нашем случае, исследование проводится по сокращенной схеме — разведение образца в 10 и 100 раз с последующим пересчётом на титр: [до 0,3]-1/20; [0,31-0,6]-1/40; [0,61-1,2]-1/80; [1,21-2,4]-1/160; [2,41-4,8]-1/320; [4,81-9,6]-1/640; [выше 9,61]-1/1280 (1).

В то же время, производитель тест-системы предоставляет возможность оценить уровень антител по коэффициенту позитивности (КП), который рассчитывается автоматически по формуле $KP = \text{ОПобразца} / \text{ОПкрит}$ без дополнительных манипуляций с образцом. КП меньше 0,8 означает отрицательный результат, КП (0,8-1,2) соответствует сомнительному результату, КП больше 1,2 указывает на положительный результат. Максимальное значение КП зависит от оптической системы ИФА-анализатора, в нашем случае он равняется 20,0.

По запросу клиницистов определение титра суммарных антител к *T. pallidum* было выполнено для 130 пациентов.

Мы сопоставили результаты определения степени позитивности положительных образцов, полученные двумя способами — по титру и по КП (см. таблицу).

	Титр антител							
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
Среднее значение КП	2,0	4,2	5,8	9,0	13,1	14,3	15,5	17,0
Диапазон КП	1,3–2,9	2,0–7,8	3,2–7,9	6,4–13,1	7,3–17,1	7,6–17,7	12,6–18,5	13,7–20,0
Количество образцов	9	10	9	15	23	25	15	24

А также, мы сравнили результаты 206 пациентов, у которых были выявлены антитела к *T. pallidum* методом ИФА, с данными, полученными двумя другими методами КСР. Результаты исследования методами МРП и РПГА были распределены на группы по степени позитивности. В 93 образцах были получены отрицательные результаты МРП, в 26 образцах — слабоположительные (1+, 2+), в 87 — положительные (3+, 4+). В группу РПГА (-) вошли 2 образца, РПГА (1+, 2+) — 9 образцов, РПГА (3+, 4+) — 195 образцов. Затем были рассчитаны средние значения КП для каждой из этих групп.

Градиент средних значений КП по отношению к результатам МРП составил 7,5 / 10,9 / 14,0 (диапазон КП: [1,3-20,0] / [2,1—18,5] / [2,0-20,0]). Для метода РПГА — соответственно — 1,5 / 3,0 / 11,7 ([1,3-1,6] / [1,3-4,8] / [1,3-20,0]).

Выводы:

Использование КП для оценки степени позитивности положительных образцов демонстрирует ряд преимуществ:

— более широкая и подробная линейка значений КП точнее отражает многообразие вариантов течения инфекционного процесса

— уменьшается разброс результатов, так как снижается суммарная вариация, присущая определению титра

— информативность рутинного теста повышается без дополнительных финансовых и трудовых затрат

— изъятие этапа дополнительного «количественно-

го» исследования сокращает время, необходимое для принятия клинического решения

Методическая литература:

1. Ткачёв В.К., Вяткина Т.Г. ИФА-диагностика сифилиса, информационно-методическое пособие, Кольцово, 2005

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ КОМПОНЕНТА СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА C1q В ДИАГНОСТИКЕ РЕЦИДИВИРУЮЩИХ АНГИОТЕКОВ

Гурьянова И.Е.¹, Любушкин А.В.¹, Белько Е.А.², Вертелко В.Р.¹, Жаранкова Ю.С.¹, Алешкевич С.Н.¹, Полякова Е.А.¹, Белевцев М.В.¹

¹ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Республика Беларусь

² Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение. Ангиотек развивается вследствие повышенной локальной проницаемости в подкожных или подслизистых капиллярах, посткапиллярных венулах, что приводит к локальной экстравазации плазмы в ответ на высвобождение вазоактивных медиаторов, возникающих при активации тучных клеток и/или базофильных гранулоцитов, или же при чрезмерной активации кинин-калликреиновой системы. Наиболее часто ангиотеки формируются вследствие активации тучных клеток, однако из-за варибельности медиаторов (гистамин, серотонин, гепарин, интерлейкины, простагландины, лейкотриены, фактор активации тромбоцитов, фактор некроза опухоли, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, трипаза, химаза, карбоксипептидаза и др.), этиопатогенетическая структура данных ангиотек разнобразна. Зачастую, при диагностике рецидивирующих ангиотек в качестве скрининговых иммунологических тестов применяют показатели, отражающие работу врожденной иммунной системы, направленную на уничтожение клеток патогенных микроорганизмов и вирусов, что не всегда позволяет оценить истинную активность иммунной системы.

Цель и задачи. Оценить эффективность клинического применения метода по определению аутоантител циркулирующих иммунных комплексов компонента системы комплемента C1q на этапе первичной диагностики рецидивирующих ангиотек.

Материалы и методы. В исследование включено 111 пациентов с рецидивирующими ангиотеками в анамнезе, 36% пациентов мужского пола (n=40) и 64% — женского (n=71). Набор группы для исследования осуществляли в период времени с 2017 по январь 2023 года. Медиана возраста пациентов на момент сдачи биологического материала составила 17 лет (диапазон: 3 месяца — 68 лет). В ходе исследования выполняли определение компонентов системы комплемента C3 и C4 турбидиметрическим методом (Konelab Primer 60i, Thermo Scientific); C1-ингибитора нефелометрическим методом

(Dade Behring BN ProSpec, Siemens); аутоантитела циркулирующих иммунных комплексов компонента системы комплемента C1q методом иммуноферментного анализа (Sunrise, Tecan); поиск аллельных вариантов в гене *SERPING1* (регионы всех экзонов, всех интронных областей и промоторной области), в девятом экзоне гена *F12* и в девятом экзоне гена *PLG* методом высокопроизводительного секвенирования (MiSeq, Illumina). Информированное согласие получено у всех пациентов и/или их официальных опекунов.

Основные результаты. У 13/111 пациентов выявлен положительный результат на наличие специфических аутоантител к C1q-компоненту системы комплемента, медиана составила 59,3 ОЕд/мл (диапазон: 20,2-163,98 ОЕд/мл), при дополнительном обследовании которых определено присутствие аутоиммунных или хронических воспалительных процессов. Среди пациентов с положительным результатом на наличие специфических аутоантител к C1q-компоненту системы комплемента у 6 выявлено снижение/повышение показателей исследуемых компонентов иммунной системы, свидетельствующее присутствию активации системы комплемента, у 7 пациентов исследуемые показатели находились в диапазоне нормальных значений. У 19/111 пациентов выявлены аллельные варианты, ассоциированные с наследственным ангионевротическим отеком (НАО), все варианты детектированы в гене *SERPING1*. Все пациенты с генетически подтвержденным НАО имели характерные для заболевания результаты тестов по определению компонентов системы комплемента C3, C4 и C1-ингибитора, в том числе у 18/19 пациентов не выявлено аутоантител к C1q-компоненту системы комплемента. Положительный результат по наличию антител к C1q у одного пациента с НАО коррелирует с наличием сочетанной аутоиммунной патологии.

Заключение. Диагностическая чувствительность метода по определению аутоантител к C1q-компоненту системы комплемента в нашем исследовании составила

66,6%, диагностическая специфичность — 98,7%, диагностическая эффективность — 93,5%, предсказательная ценность положительного результата — 90,9%, предсказательная ценность отрицательного результата — 93,8%. Таким образом, полученные данные демонстрируют положительные результаты применения теста по определению аутоантител циркулирующих иммунных комплексов

компонента системы комплемента C1q при определении направления углубленных исследований в диагностике рецидивирующих ангиоотектов.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке ГНТП «Фундаментальные и прикладные науки — медицине, 2016–2020 годы» (подпрограмма «Диагностика и терапия заболеваний») (№ госрегистрации 20190517).

ПОВЫШЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ АМПЛИФИКАЦИИ УЧАСТКА ГЕНА SMN1 С ПОМОЩЬЮ ВКЛЮЧЕНИЯ ЗАБЛОКИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ (LNA) В ПРАЙМЕР

Ермаченко Е.Д., Романов А.С., Лисок А.В.

ООО «Компания Алкор Био», Санкт-Петербург, Россия

Ведение. С 2023 года в России стартовал проект расширенного неонатального скрининга, в который была включена молекулярно-генетическая диагностика спинально-мышечной атрофии. Наиболее частой причиной СМА является делеция 7 экзона или 7-8 экзонов гена SMN1. Именно на эту мишень должна быть нацелена тест-система. При работе с геном SMN1 необходимо учитывать его высокую степень гомологии с геном SMN2, целевой участок которого отличается всего на пять нуклеотидов. Они расположены таким образом, что каждый подобранный олигонуклеотид может захватывать не более одного дифференциального нуклеотида. Поэтому крайне важно оптимизировать тест-систему, чтобы исключить ложноотрицательные результаты. Кроме того, целевая последовательность имеет очень низкий GC-состав, что требует дополнительной оптимизации.

Целью этой работы является оптимизация праймеров для специфичной амплификации участка 7 экзона гена SMN1. Основная задача — опробовать применение модификаций, увеличивающих специфичность реакции и повышающих температуру отжига олигонуклеотидов.

Материалы и методы. При разработке дизайна олигонуклеотидов были использованы: сервис UCSC genome browser hg38, ПО Oligo7, OligoAnalyzer™ Tool, Primer3Plus, Ugene. Олигонуклеотиды, в том числе содержащие модификации, были заказаны в ГК «Алкор Био». Для отработки системы были применены методы: ПЦР с последующей визуализацией продуктов методом гель-электрофореза в 3 % агарозном геле, секвенирование по Сэнгеру. В качестве матрицы была использована ДНК двух плазмид (плазмида №1 и плазмида №2), заказанных в ООО «Евроген», включающих последовательность 7 экзона генов SMN1 и SMN2 соответственно.

Основные результаты. Нами были синтезированы и проверены шесть прямых и шесть обратных праймеров с применением заблокированных нуклеотидов (LNA). В качестве контроля были синтезированы праймеры без модификаций. В Таблице 1 указаны положения модифицированных нуклеотидов, которые обозначены символом L. Длина прямого и обратного праймеров составила 23 и 22 нуклеотида соответственно.

ТАБЛИЦА 1. ПОЗИЦИИ ЗАБЛОКИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Название прямого праймера	Последовательность прямого праймера	Название обратного праймера	Последовательность обратного праймера
F1	-----	R1	-----
LnaF1	----- L -----	LnaR1	----- L -----
LnaF2	---- L ---- L -----	LnaR2	----- L ----- L --
LnaF3	----- L --	LnaR3	----- L -
LnaF4	----- L ----- L --	LnaR4	----- L ----- L -
LnaF5	----- L ----- L L -	LnaR5	----- L ----- L L -
LnaF6	----- L ----- L -	LnaR6	----- L ----- L ----

Ввиду довольно низкого GC-состава, расчетная температура плавления прямого не модифицированного праймера составила всего 45 оС, а обратного — 47 оС. Следовательно, предполагаемая температура отжига должна

быть в диапазоне 40-42 оС, что будет крайне негативно отражаться на специфичности системы. Благодаря внесению модификаций, нам удалось получить систему, имеющую температуру отжига 50-54 °С. Следует отметить, что состав

реакционной смеси и условия реакции (за исключением температуры отжига) были неизменными, как для обычных праймеров, так и для праймеров, содержащих LNA. В отличие от не модифицированных олигонуклеотидов, у некоторых пар праймеров с LNA наблюдалась значительно большая специфичность. Для модифицированных праймеров в случае использования в ПЦР в качестве матрицы плазмиды, несущей последовательность гена SMN1, в полученном агарозном геле мы наблюдали четкий фрагмент, соответствующий по размеру ожидаемому. При амплификации участка плазмиды №2, несущей последовательность гена SMN2, ПЦР-продукт отсутствовал либо был значительно менее выражен. Полученные ампликоны были просеквенированы по Сэнгеру с целью подтверждения амплификации целевого продукта. Благодаря результатам секвенирования было получено доказательство специфичности системы. Однако, стоит сказать, что не все внесенные модификации улучшали ПЦР. Для некоторых комбинаций ПЦР-продукт отсутствовал как на плазмиде №1, так и на плазмиде №2, либо был зна-

чительно слабее, что говорит о значительном снижении эффективности амплификации. Лучшей комбинацией оказались LnaF1-LnaR2; LnaF4-LnaR1 — при температуре отжига 52 °С, и комбинация LnaF2-LnaR3 при температуре отжига 50 °С. При использовании этих пар праймеров мы получили наибольшее количество ПЦР-продукта при амплификации плазмиды №1, при этом ПЦР-продукт при амплификации плазмиды №2 полностью отсутствовал. В результате мы получили модифицированные праймеры, которые позволяют эффективно амплифицировать целевой участок 7 экзона гена SMN1 без наработки высокомолекулярного фрагмента гена SMN2.

Заключение. Включение заблокированных нуклеотидов в праймеры позволяет улучшить термодинамические характеристики системы и увеличить специфичность. Таким образом, мы сможем исключить ложноотрицательные результаты тест-системы. При этом, применение трех и более модифицированных нуклеотидов в праймере может негативно сказываться на эффективности амплификации.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ СТАРЕНИЯ И ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ

Копенкин М.А., Базарный В.В., Полушина Л.Г., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В.

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Екатеринбург, Россия

Введение. Старение населения является значимой демографической тенденцией. Ценным инструментом в оценке здоровья лиц старших возрастных групп могут быть биомаркеры старения — признаки, по которым можно охарактеризовать функциональное состояние организма лучше, чем по хронологическому возрасту. Интересна связь апоптоза со старением, в частности маркеров внешнего пути апоптоза, опосредованного связыванием рецепторов семейства TNFR, в частности Fas-рецептора. Индуктором апоптоза является фактор некроза опухоли альфа (TNF α) и трансмембранный пептид Fas-лиганд (FasL), связывающийся только с Fas-рецептором. Выявление TNF α и в особенности FasL в биожидкостях организма может отражать выраженность процессов апоптоза. Перспективным материалом для лабораторных исследований является ротовая жидкость (РЖ), которая образуется смесью секретов слюнных желез, продуктами слизистой оболочки полости рта, десневой жидкостью. Однако, состав РЖ, как органоспецифического компонента полости рта, может меняться при заболеваниях полости рта, в том числе ассоциированных со старением, таких как хронический генерализованный пародонтит (ХГП) и красный плоский лишай полости рта (КПЛ).

Цель — оценить содержание TNF α и FasL в РЖ относительно здоровых лиц молодого, зрелого и пожилого возраста, а также связь данных пептидов с возраст-ассоциированными заболеваниями полости рта.

Материалы и методы. Было проведено одномоментное исследование, в котором приняло участие 54 человека. Здоровые люди были разделены на три группы в зависимости от возраста: группа молодых людей от 18 до

44 лет (n=10), группа лиц зрелого возраста от 45 до 59 лет (n=10), группа пожилого возраста от 60 до 74 лет (n=12). Кроме того, были сформированы группы пациентов пожилого возраста с возраст-ассоциированной патологией полости рта: пациенты с ХГП средней степени тяжести (n=12), пациенты с КПЛ (n=12). РЖ является не стандартизированной биожидкостью, поэтому все результаты нормализовались по уровню общего белка, который определяли методом с пирогалловым красным (Вектор-бест, Россия) на ручном фотометре (ROKI, Япония). Для определения содержания TNF α и FasL в РЖ использовали метод мультипараметрического флуоресцентного анализа с магнитными микросферами (технология xMAP, Luminex 200, USA), тест системы «TNF alpha Human ProcartaPlex Simplex Kit», «Fas-L Human ProcartaPlex Simplex Kit» (Invitrogen, USA). Критический уровень значимости был установлен на уровне $p < 0,05$. Результаты представлены как медиана, 1-й квартиль — 3-й квартиль. Использовали критерий Краскела-Уоллиса, тест Данна с поправкой Холма-Бонферрони для проверки различий между группами.

Основные результаты. Было рассмотрено содержание TNF α и FasL в РЖ, нормализованное по концентрации общего белка, у относительно здоровых людей различных возрастных групп. Установлено, что уровень TNF α не имел статистически значимых различий между группами здоровых лиц молодого, зрелого и пожилого возраста. Концентрация FasL в РЖ молодых людей не отличалась от группы здоровых лиц зрелого возраста, однако у испытуемых пожилого возраста — 36,72 (7,54 — 92,64) — была значимо ниже ($p < 0,05$), чем в группе молодого возраста — 122,58

(80,05 — 189,67). Затем был рассмотрен уровень TNFα и FasL у пациентов пожилого возраста с возраст-ассоциированными заболеваниями. Так, пациенты с ХГП средней степени тяжести, как и пациенты с КГЛ не имели значимых различий в содержании TNFα и FasL по сравнению со здоровыми людьми данного возрастного периода ($p > 0,05$). Был проведен ROC-анализ для оценки качества бинарной классификации рассмотренных групп: молодого и зрелого возраста по сравнению со здоровыми людьми пожилого возраста. Пло-

щадь под ROC-кривой (AUC), отражающая эффективность классификации, составила 0,741, что говорит об умеренной точности теста. Чувствительность составила 66,67%, специфичность — 87,50% при cut-off « $< 64,38$ пг/мл».

Заключение. Здоровые люди пожилого возраста отличались от группы молодых людей меньшим содержанием FasL в РЖ, что может говорить о снижении активности апоптоза. Уровень саливарного FasL можно рассматривать как потенциальный молекулярный маркер старения.

ЧАСТЬ 1. МЕТАБОЛОМНЫЙ ПАТТЕРН КРОВИ И ТКАНЕЙ ОРГАНОВ КРЫС ПОСЛЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОТ ПЕРЕНЕСЕННОЙ ОСТРОЙ ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИИ УКАЗЫВАЕТ НА СОХРАНЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО ДИСБАЛАНСА МЕТАБОЛИТОВ

Шурубор Е.И., Кескинов А.А., Юдин В.С., Красников Б.Ф.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России

Введение. Острая гепатоэнцефалопатия (ГЭ) — это потенциально обратимое нейродегенеративное заболевание, возникающее в результате отравления печени токсичными веществами. Ранее было показано, что большая часть клеток печени погибает в первые 24 часа с момента возникновения острой ГЭ, а восстановление, с полной заменой гепатоцитов, наступает через 3 дня [1]. Был проведен метаболомный анализ плазмы крови и органов крыс спустя 6 дней после интоксикации тиаоацетамидом (ТАА). В полученных образцах были рассмотрены: уровни энергетических метаболитов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), коэнзим А (КоА), ацетил-коэнзим А (АКоА), а также основные аминокислоты (АК). Полученные результаты корректируют полученные ранее выводы о полном восстановлении печени крыс через 3 дня после интоксикации и указывают на то, что остаточный дисбаланс ключевых метаболитов сохраняется гораздо дольше. Данное обстоятельство может быть полезно при планировании терапевтических интервенций.

Цель работы. Оценка метаболома плазмы крови и органов крыс после их полного восстановления от острой ГЭ.

Задачи. Основными задачами исследования были: (а) создание ТАА-модели крыс с острой ГЭ; (б) восстановление крыс после перенесенной острой ГЭ; (в) оценка уровней метаболитов АК, КоА, АКоА и ЦТК в плазме крови и органах контрольных и ТАА-индуцированных крыс.

Материал. В эксперименте были использованы белые лабораторные крысы линии Wistar, самцы, весом 140–150 г. Животным были сделаны разовые внутрибрюшинные инъекции раствора ТАА в концентрациях 0 ($n=3$), 200 ($n=3$), 400 ($n=6$) и 600 ($n=6$) мг/кг. В образцах плазмы крови, тканей печени, почек и мозга крыс ($n=72$) были измерены уровни 16 АК, КоА, АКоА и 11 метаболитов ЦТК.

Методы. Для анализа метаболитов использовали разработанные ранее методы ВЭЖХ-УФ (метаболиты ЦТК, КоА, АКоА) и ВЭЖХ-ФЛУ (АК) [2–4] анализа. Анализ полученных данных проводили с использованием теста Тьюки и процедуры Бенджамини-Хохберга.

Основные результаты. Детали исследования приведены в работах [2–4].

Вкратце:

1. Полученные данные по оценке уровней АК в образцах крыс после однократного введения ТАА в дозах 200–600 мг/кг указывают, что баланс отдельных АК, групп АК (ароматических, разветвлённых, незаменимых и заменимых АК) в плазме крови и тканях органов крыс после выздоровления полностью восстановлен не был. Характер распределения АК в образцах ТАА-индуцированных крыс свидетельствует о наличии различных дозозависимых и орган-зависимых механизмов восстановления. Так, уровни общего пула АК в плазме крови, тканях печени и почек ТАА-индуцированных крыс даже после завершения восстановительного периода оставались несколько повышенными (~ на 10–30%), а в мозге — несколько пониженными (~ на 20–35%). Из индивидуальных АК существенная разница между уровнями метаболитов в контрольных и ТАА-индуцированных группах крыс в плазме крови наблюдалась для фенилаланина, цитруллина, метионина ($p < 0,05$) и лизина ($p < 0,1$); в печени крыс для метионина, лизина, орнитина и глутамин ($p < 0,05$); в мозге крыс для лейцина ($p < 0,1$). В почках крыс статистически значимой разницы не наблюдалось. Тренды в распределении незаменимых и заменимых АК, разветвлённых и ароматических АК, в целом, повторяли таковые общего пула АК. Исключение составили ткани печени, где уровень заменимых АК был в ~2–3 раза выше контрольных значений и ткани мозга крыс, где уровень разветвлённых АК не снижался, а наоборот, был повышен на ~40%.

2. Похожий паттерн распределения метаболитов в образцах контрольных и ТАА-индуцированных крыс наблюдался и при анализе коферментов КоА и АКоА. Статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) для КоА и АКоА были обнаружены в плазме крови крыс ТАА-400 мг/кг и в печени крыс ТАА-600 мг/кг. При увеличении дозы ТАА уровень КоА в плазме крови «выздоровевших» крыс

оставался ниже на ~30-35% и АКоА выше на ~25-50% от контрольных значений. В тканях печени крыс уровни КоА и АКоА оставались сниженными, соответственно, на ~10-20% и ~25-60%. В тканях почек уровни КоА и АКоА, наоборот, были повышены, соответственно, на ~10-20% и в ~4 раза. В тканях мозга уровень КоА оставался выше на ~10-30%, а уровень АКоА был снижен на такую же величину (~10-35%). Соотношение АКоА/КоА, отражающее баланс между анаболическими и катаболическими процессами в органах крыс после их восстановления, превышало контрольные значения в плазме крови и почках крыс в ~2 и ~3-4 раза, соответственно. В тканях печени и мозга крыс это соотношение было ниже контрольных значений в ~2 раза.

3. Уровни биоэнергетических метаболитов ЦТК в плазме крови и органах крыс после перенесенной острой ГЭ также указывают на наличие различных механизмов восстановления. Существенная разница в концентрациях метаболитов ЦТК между группами ТАА-индуцированных и контрольных крыс в плазме крови сохранялась для сукцинил-КоА (SКоА), в печени крыс для α -кетоглутарата (α КГ), сукцината ($p \leq 0,05$), а также α -кетоглутарамата (α КГМ) и соотношения α КГ/ α КГМ ($p \leq 0,1$). В почках ТАА-индуцированных крыс значимая разница была обнаружена для SКоА, изоцитрата ($p \leq 0,05$) и соотношения пируват/лактат ($p \leq 0,1$). Соотношение в α КГ/ α КГМ в мозге крыс также коррелировало с остаточной интоксикацией ($p \leq 0,1$).

Таким образом, анализ полученных данных указывает на наличие различных трендов в восстановлении органов

крыс после интоксикации. Паттерн распределения метаболитов в образцах крыс указывает на заметное сродство в тандеме таких жизненно важных органов и сред как печень и мозг, почки и плазма крови крыс.

Заключение. Результаты метаболомного анализа плазмы крови и тканей органов крыс указывают на то, что полного восстановления метаболомного паттерна до нормы после перенесенной острой ГЭ не произошло, несмотря на длительный период восстановления.

Литература:

1. Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A, Cascales M. Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology*. 1993; 18, 912-918.

2. Shurubor YI, Rogozhin AE, Isakova EP, Deryabina YI, Krasnikov BF. Residual Amino Acid Imbalance in Rats during Recovery from Acute Thioacetamide-Induced Hepatic Encephalopathy Indicates Incomplete Healing. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(4):3647.

3. Shurubor YI, Cooper AJL, Krasnikov AB, Isakova EP, Deryabina YI, Beal MF, Krasnikov BF. Changes of Coenzyme A and Acetyl-Coenzyme A Concentrations in Rats after a Single-Dose Intraperitoneal Injection of Hepatotoxic Thioacetamide Are Not Consistent with Rapid Recovery. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(23):8918.

4. Shurubor YI, Rogozhin AE, Isakova EP, Deryabina YI, Krasnikov BF. Tricarboxylic Acid Metabolite Imbalance in Rats with Acute Thioacetamide-Induced Hepatic Encephalopathy Indicates Incomplete Recovery. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(2):1384.

PART 1. METABOLOMIC PATTERN OF BLOOD AND TISSUES OF RAT ORGANS AFTER RECOVERY FROM ACUTE HEPATOENCEPHALOPATHY INDICATES ON PRESERVATION OF RESIDUAL METABOLITE IMBALANCE

Shurubor E.I., Keskinov A.A., Yudin V.S., Krasnikov B.F.

Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia

Introduction. Acute hepatoencephalopathy (HE) is a potentially reversible neurodegenerative pathology resulting from toxic liver poisoning. It has been shown that during the development of acute HE, the maximum number of liver cells die in the first 24 hours, and recovery with the replacement of hepatocytes occurs after 3 days [1]. We performed a metabolomic analysis of blood plasma and organs of rats after 6 days of their intoxication with thioacetamide (TAA). In the obtained samples, the levels of energy metabolites of the tricarboxylic acid cycle (TCA), coenzyme A (CoA), acetyl-coenzyme A (ACoA), as well as basic amino acids (AA) were considered. The results obtained correct the previous conclusions about the complete recovery of the rat liver after 3 days and show that the residual imbalance of key metabolites at the metabolomic level persists much longer. This circumstance may be useful in planning therapeutic interventions.

The purpose of the work. Assessment of the metabolome after complete recovery of rats from acute HE.

Objectives. The main objectives of the study were: (a) creation of a TAA model of rats with acute HE; (b) recovery of

rats after acute HE; (c) assessment of the levels of metabolites of AA, CoA, ACoA, and TCA in the blood plasma and organs of control and TAA-induced rats.

Materials. White laboratory rats of the Wistar line, males, weighing 140–150 g were used in the experiment. The animals were given single intraperitoneal injections of TAA solution at concentrations of 0 ($n=3$), 200 ($n=3$), 400 ($n=6$) and 600 ($n=6$) mg/kg. The levels of 16 AA, CoA, ACoA and 11 TCA metabolites were measured in blood plasma, liver, kidney and brain tissues of rats ($n=72$).

Methods. For the analysis of metabolites, the previously developed HPLC-UV methods (metabolites of TCA, CoA, ACoA) and HPLC-FL (AA) were used [2–4]. The analysis of the data obtained was performed using Tukey's tests and the Benjamini-Hochberg procedure.

Main results. Detailed results are described in [2–4].

Briefly:

1. The obtained data on the assessment of the level of AA in rat samples after a single injection of TAA at doses of 200–600 mg/kg indicate that the balance of individual AA, groups of

AA (aromatic, branched, essential and nonessential AA) in the blood plasma and tissues of organs of rats has not been fully restored. The nature of the distribution of AA in the samples of TAA-induced rats indicates the presence of various dose-dependent and organ-dependent recovery mechanisms. Thus, the levels of the total pool of AA in the blood plasma, liver and kidney tissues of TAA-induced rats, even after the completion of the recovery period, remained somewhat elevated (~10–30%), and decreased in the brain (~20–35%). For the individual AA, a statistically significant difference between the levels of metabolites in the control and TAA-induced groups of rats was observed in plasma: for phenylalanine, citrulline, methionine ($p < 0.05$) and lysine ($p < 0.1$); in rat liver: for methionine, lysine, ornithine and glutamine ($p < 0.05$); in rat brain: for leucine ($p < 0.1$). No statistically significant difference was observed in rat kidneys. Trends in the distribution of essential and nonessential AAs, branched and aromatic AAs, in general, repeated those for the general pool of AAs. The exceptions were liver tissues, where the level of replaceable AAs was ~2–3 times higher than control values, and the brain of rats, where the level of branched AAs did not decrease, but, on the contrary, was increased by ~40%.

2. A similar pattern of distribution of metabolites in the samples of control and TAA-induced rats was also observed in the analysis of coenzymes CoA and ACoA. Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) for CoA and ACoA were found in the blood plasma of TAA-400 mg/kg rats and in the liver of TAA-600 mg/kg rats. With an increase in the dose of TAA, the level of CoA in the blood plasma of rats decreased by ~30–35%, and ACoA increased by ~25–50%. In rat liver tissues, the levels of CoA and ACoA decreased by ~10–20% and ~25–60%, respectively. In kidney tissues, on the contrary, the levels of CoA and ACoA increased by ~10–20% and ~4 times, respectively. In brain tissues, the level of CoA increased by ~10–30%, while the level of ACoA decreased by the same amount (~10–35%). The ratio of ACoA to CoA, which reflects the balance between anabolic and catabolic processes in the organs of rats after their recovery, exceeded the control values in the blood plasma and kidneys of rats by ~2 and ~3–4 times, respectively. In the tissues of the liver and brain of rats, this ratio was ~2 times lower than the control values.

3. The levels of bioenergetic metabolites of TCA in the blood plasma and organs of rats after HE also indicates the presence of various recovery mechanisms. A statistically significant difference in the concentrations of TCA metabolites between the groups of TAA-induced and control rats in blood plasma was found for succinyl-CoA (SCoA), in the liver of rats for α -ketoglutarate (α KG), succinate ($p \leq 0.05$), and α -ketoglutaramate (α KGM) and α KG/ α KGM ratio ($p \leq 0.1$). In the kidneys of TAA-induced rats, a significant difference was found for SCoA, isocitrate ($p \leq 0.05$), and pyruvate/lactate ratio ($p \leq 0.1$). The ratio in α KG/ α KGM in the brain of rats also correlated with residual intoxication at $p \leq 0.1$.

Thus, the analysis of the data obtained indicates the presence of various trends in the recovery of rat organs after intoxication. The distribution pattern of metabolites in rat samples indicates a marked affinity in tandem of such vital organs and media as the liver and brain, kidneys and blood plasma of rats.

Conclusion. The results of metabolomic analysis of blood plasma and organ tissues of rats show that the complete recovery of the metabolic pattern to normal after acute HE did not occur, despite the long recovery period.

References:

1. Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A, Cascales M. Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology*. 1993; 18:912–918.
2. Shurubor YI, Rogozhin AE, Isakova EP, Deryabina YI, Krasnikov BF. Residual Amino Acid Imbalance in Rats during Recovery from Acute Thioacetamide-Induced Hepatic Encephalopathy Indicates Incomplete Healing. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(4):3647.
3. Shurubor YI, Cooper AJL, Krasnikov AB, Isakova EP, Deryabina YI, Beal MF, Krasnikov BF. Changes of Coenzyme A and Acetyl-Coenzyme A Concentrations in Rats after a Single-Dose Intraperitoneal Injection of Hepatotoxic Thioacetamide Are Not Consistent with Rapid Recovery. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(23):8918.
4. Shurubor YI, Rogozhin AE, Isakova EP, Deryabina YI, Krasnikov BF. Tricarboxylic Acid Metabolite Imbalance in Rats with Acute Thioacetamide-Induced Hepatic Encephalopathy Indicates Incomplete Recovery. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(2):1384.

ВЛИЯНИЕ РЕПЛИКАТИВНОГО И ИНДУЦИРОВАННОГО СТАРЕНИЯ НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Савицкий Д.В.¹, Линькова Н.С.^{1,2}, Козлов К.Л.^{1,3}, Кветная Т.В.¹

¹ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Известно, что при ассоциированных с возрастом заболеваниях сердечно-сосудистой системы происходит нарушение процессов клеточного обновления в эндотелии. Дисбаланс пролиферации и апоптоза эндотелиоцитов может приводить к нарушению целостности сосудов и инициации развития атеросклероза. В связи с этим актуальной задачей молекулярной геронтологии является

изучение влияния процесса старения на пролиферативный потенциал эндотелия сосудов. Цель работы — оценить синтез пролиферотропных протеинов Ki67 и PCNA в эндотелии сосудов человека при репликативном и индуцированном липополисахаридом старении.

Материалы и методы исследования. Эндотелиоциты пупочной вены человека (HUVEC) выращивали в среде

DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% смеси пенициллина и стрептомицина. Репликативное старение клеток осуществляли при их культивировании до 18 пассажа. Пассаж, соответствующий «старым» культурам, был определен экспериментально по снижению жизнеспособности клеток с использованием MTS-теста. Индуцированной моделью клеточного старения явилось применение липополисахарида (ЛПС). На 3 пассаже клетки рассеивали в концентрации 6×10^6 на одну лунку 6-луночного планшета и выращивали в течение 12 ч. Затем в течение 6 суток проводили инкубацию с ЛПС (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O55:B5, Sigma, USA) в концентрации 0,5 мкг/мл. Контрольные культуры клеток выращивали в тех же условиях без добавления ЛПС.

Для проведения вестерн-блот анализа белок изолировали из клеток с использованием RIPA-буфера и набора Extraction Kit. Концентрацию Ki67 и PCNA измеряли с помощью BCA™ Protein Assay Kit. Белок выделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Сигналы белков на полосах визуализировали с помощью хемилюминесценции (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Уровни экспрессии белков определяли количественно методом денситометрии с использованием программного обеспечения ImageJ 64 (National Institutes of Health, USA) по отношению к экспрессии β -актина. Для анализа данных использовали программу SPSS 21.0. Рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку. Достоверность различий между группами оценивали по критерию Стьюдента или с применением одностороннего дисперсионного анализа ANOVA. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. При репликативном старении эндотелиоцитов относительная интенсивность количества пролиферотропного протеина Ki67 снижается почти в 2 раза. При индуцированном ЛПС старении клеток сосудов синтез Ki67 достоверно не из-

меняется. При репликативном старении эндотелиоцитов содержание белка PCNA в клетках снижается в 2,2 раза, а ЛПС-индуцированное старение не оказывает влияния на этот показатель.

В работе Guerrero и соавт. (2021) продемонстрировано снижение интенсивности флуоресценции PCNA в клетках HUVEC на 15-м пассаже (модель репликативного старения) [1], что согласуется с полученными нами данными. В другом исследовании наблюдали снижение синтеза Ki67 в клетках HUVEC на 15-м пассаже при воздействии провоспалительного цитокина TNF- α , что является моделью индуцированного старения [2]. Интересно, что согласно полученным нами результатам, при ЛПС-индуцированном старении не происходит снижения синтеза пролиферотропных белков PCNA и Ki67 в клетках HUVEC, хотя TNF- α является одним из основных провоспалительных цитокинов, синтезируемых в организме в ответ на введение ЛПС и активацию рецепторов TLR4 [3].

Заключение. Таким образом при ЛПС-индуцированном старении, которое является моделью преждевременного старения вследствие воздействия внешних факторов, не происходит снижения пролиферативного потенциала клеток. При этом репликативное старение эндотелиоцитов характеризуется снижением их пролиферативного потенциала.

Литература.

1. Guerrero F., et al. Passage Number-Induced Replicative Senescence Modulates the Endothelial Cell Response to Protein-Bound Uremic Toxins. *Toxins (Basel)* 2021. 13(10): 738.
2. Khan S.Y., et al. Premature senescence of endothelial cells upon chronic exposure to TNF α can be prevented by N-acetyl cysteine and plumericin. *Sci. Rep.* 2017. 3(7): 39501.
3. Raschi E., et al. β 2-glycoprotein I, lipopolysaccharide and endothelial TLR4: three players in the two hit theory for anti-phospholipid-mediated thrombosis. *J. Autoimmun.* 2014. 55: 42-50.

ДЛИТЕЛЬНАЯ АЛКОГОЛИЗАЦИЯ КРЫС РОДА WISTAR ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ УРОВНЯ МРНК IL13 И TGF β В РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Игнатова П.Д.¹, Ереско С.О.^{1,2}, Айрапетов М.И.^{1,3}

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины (ФГБНУ ИЭМ), Санкт-Петербург, Россия

² Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Министерства здравоохранения Российской Федерации (СЗГМУ им. И.И. Мечникова), Санкт-Петербург, Россия

³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации (ВМедА), Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Изменения в системе цитокинов среди различных отделов головного мозга при длительной алкоголизации могут быть задействованы в механизмы развития нейровоспаления. Вполне возможно, что изменения в системе цитокинов могут служить и модуляторами работы нейромедиаторных систем, так как показано наличие рецепторов к многим цитокинам на нейрональных клетках (нейроны, астроглия), что может вносить свой вклад в эмоциональные механизмы развития поведенческих расстройств, характерных для состояния хронической алкоголизации (например,

повышение уровня влечения к употреблению алкоголя). Изменения в экспрессии цитокинов IL13 и TGF β отмечаются при развитии патологий центральной нервной системы. Так, участие IL13 показано в регуляции иммунного ответа при болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, черепно-мозговой травме, остром нарушении мозгового кровообращения, неонатальной гипоксии и в развитии фетального алкогольного спектра нарушений. При моделировании состояния длительной алкоголизации состояние экспрессии данных цитокинов изучено недостаточно.

Цель и задачи. Для проведения эксперимента была смоделирована длительная алкоголизация крыс с дальнейшей целью определения уровня экспрессии IL13 и TGFbeta в эмоциогенных структурах головного мозга у крыс при длительной алкоголизации.

Материалы и методы. Моделирование эксперимента проводилось на самцах крыс рода Wistar (n=24) путем внутривентрикулярного введения 20%-ого раствора этанола (2 г/кг) через зонд в течение 2 месяцев. Контрольная группа крыс получала эквивалентное количество воды внутривентрикулярно через зонд. На последний день длительной алкоголизации проводился забор структур головного мозга: префронтальной коры (mPFC), гиппокампа (HIPP), миндаля (AMY), гипоталамуса (Нур), выделение РНК, синтез кДНК и постановка реал-тайм ПЦР. Полученные данные были статистически обработаны. Данные считались статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

Основные результаты. Результаты данного исследования показали в mPFC уменьшение уровня мРНК IL13 в 1,78 раз относительно контрольной группы. мРНК TGFbeta

в данной структуре увеличилась в 2,24 относительно контрольной группы. В HIPP наблюдалось увеличение мРНК обоих цитокинов после длительной алкоголизации: IL13 в 1,77 раз, TGFbeta в 2,5 раза по отношению к контрольным значениям. При исследовании мРНК TGFbeta в Нур выявлено уменьшение данной РНК по отношению к контрольной группе в 1,22 раза. В AMY мРНК TGFbeta относительно контрольных значений изменений не наблюдалось.

Выводы. Результаты показали разнонаправленные изменения уровня мРНК исследуемых цитокинов в различных структурах головного мозга. Полученные данные об изменении экспрессии генов цитокинов могут свидетельствовать о вовлеченности этих цитокинов в патогенетические механизмы, вызванные длительной алкоголизацией, в этих структурах мозга. В дальнейшем представляется интересным оценить полученные изменения методом ИФА, а также в других моделях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя на разных сроках. Результаты таких исследований могут предоставить сведения о новых молекулярных мишенях с целью воздействия на них фармакологическими агентами.

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ – ОСНОВА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА ПРИ СКРИНИНГЕ НА ВРОЖДЕННЫЕ БОЛЕЗНИ МЕТАБОЛИЗМА У ДЕТЕЙ

Мамедов И.С.

ГБУЗ Научно-практический центр специализированной медицинской помощи детям имени В.Ф.Войно-Ясенецкого Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия.

Актуальность. Селективный скрининг детей на наследственные болезни обмена веществ остается актуальной проблемой здравоохранения Российской Федерации, и использование масс-спектрометрических методов диагностики этих заболеваний поможет решить эту проблему.

Цель исследования. Выявить значение и эффективность хромато-масс-спектрометрии в лабораторной диагностике наследственных болезней обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, оценить референсные интервалы для соответствующих показателей, а также разработать новые алгоритмы клинико-лабораторного ана-

лиза врожденных метаболических нарушений у детей. Определить потенциальную диагностическую эффективность выявления взаимосвязей между масс-спектрометрическими показателями у детей с наследственными болезнями обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот.

Материалы и методы. Обследовано 152 пациента с момента рождения до 18 лет, из которых 57 — с клинической картиной, характерной для врожденных метаболических заболеваний, 95 — практически здоровые дети, вошедшие в контрольную группу. Оценены лабораторные показатели спектров аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот.

ТАБЛИЦА 1. МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРОВ МЕТАБОЛИЗМА ПО ГРУППАМ

Группы веществ	Биоматериал	Количество показателей в одной пробе	Метод диагностики
Аминокислоты и ацилкарнитины	Сухие пятна крови	42 (12 аминокислот, 30 ацилкарнитинов)	ВЭЖХ-МС/МС
Органические кислоты	Моча	28	ГХ-МС

Анализ на аминокислоты, ацилкарнитины проводился с использованием ВЭЖХ-системы серии Agilent 1200, вакуумного дегазатора соединённых с масс-детектором Agilent QQQ6475. Значения концентраций аминокислот и ацилкарнитинов рассчитывались автоматически с применением внутренних стандартов.

Анализ органических кислот выполнялся методом

газовой хроматографии — масс-спектрометрии на газовом хроматографе с масс-спектрометром SHIMADZU 2030 (Япония), колонка HP-5MS (30 мх0.32 ммх0,25 мкм; Agilent Technologies, США). Концентрация органических кислот в моче определялась в виде триметилсилиловых эфиров. Расчет полученных результатов осуществлялся методом внутреннего стандарта.

Состав и скорость растворителей, а также условия деструктирования подбирались экспериментально.

Для оценки различий между возрастными группами использовался непараметрический метод сравнения множества независимых групп — метод Краскела-Уоллиса. Сравнение средних значений проводилось по критерию Манна-Уитни. Для доказательства диагностической значимости использовался метод построения ROC-кривых. Также использовался иерархический кластерный анализ и тепловые карты на основе корреляции по Спирмену, корреляционный анализ проводился с помощью языка программирования R.

Результаты. По результатам выборочного скрининга диагностики врожденных заболеваний обмена веществ подтверждены у 52 детей. Разработаны научные обоснования для алгоритмов диагностики наследственных болезней обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот. Определена более высокая диагностическая эффективность применяемых алгоритмов по сравнению с существующими.

По результатам корреляционного анализа, как и ожидалось, наиболее метаболически близкие соединения, например, короткоцепочечные ацилкарнитины, имели наиболее высокую корреляцию ($r > 0.95$, $p < 0.001$). Однако корреляционная взаимосвязь проявлялась и среди метаболически слабо связанных аминокислот, например, метионином и тирозином ($r = 0.73$, $p < 0.001$), а также содержание орнитина имело достаточно выраженную корреляцию с уровнями аспарагиновой кислоты ($r = 0.55$, $p < 0.001$) и глутаминовой кислоты ($r = 0.48$, $p < 0.001$).

По результатам кластерного анализа можно отметить

наличие корреляций между органическими кислотами, казалось бы, химически и метаболически далекими друг от друга. Так, 3-гидрокси-3-метилглутаровая кислота, являясь предшественником холестерина, коррелирует с гиппуровой кислотой — метаболитом глицина ($r = 0.78$, $p < 0.001$), а гиппуровая кислота, имеет выраженную корреляцию с фенилмолочной кислотой — метаболитом фенилаланина ($r = 0.41$, $p < 0.001$).

Наличие статистически достоверных внутригрупповых корреляций между различными лабораторными показателями определяет потенциальную эффективность научного использования этих множеств данных, как объекта для дальнейших исследований метаболизма и разработки новых маркеров нарушений обмена веществ.

Заключение. Впервые доказано, что мультиплексное лабораторное количественное определение актуальных метаболитов различными валидированными хроматографическими методами с масс-спектрометрическим детектированием эффективно для ранней и точной диагностики наследственных нарушений обмена аминокислот, органических кислот, ацилкарнитинов у детей. Таким образом, анализ результатов, полученные в настоящем исследовании, показал, что благодаря значительному увеличению числа и объемов выборок с последующим созданием на их основе достаточных массивов данных появляется возможность использовать параметрические критерии, применимые в разных видах статистического анализа (например, кластерном и корреляционном), что, в итоге, позволит выявить новые маркеры, или целые маркерные профили, и, следовательно, проводить дифференциальную диагностику НБО веществ более эффективно.

ВЛИЯНИЕ АЗИТРОМИЦИНА НА СОСТОЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СИСТЕМЫ TLR4-СИГНАЛИЗАЦИИ В ПРИЛЕЖАЮЩЕМ ЯДРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ОТМЕНЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Матвеев Н.М.¹, Щукина А.А.¹, Ереско С.О.^{1,2}, Айрапетов М.И.^{1,3}, Игнатова П.Д.¹, Михайлова А.А.¹, Ганьшина Д.А.¹, Суханова Д.Д.¹, Косякова Г.П.¹, Лебедев А.А.¹, Бычков Е.Р.¹, Шабанов П.Д.¹

¹ Институт экспериментальной медицины (ИЭМ), Санкт-Петербург, Россия

² Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова (СЗГМУ им. И.И. Мечникова), Санкт-Петербург, Россия

³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации (ВМА им. С.М. Кирова МО РФ), Санкт-Петербург, Россия

Введение. Длительное употребление алкоголя является причиной активации путей нейровоспаления за счет повышенной активности TLR-сигнальных внутриклеточных путей. Прилежащее ядро (Nucleus accumbens, NAc) — вентральная часть стриатума головного мозга, является важной частью мезолимбического пути, участвующего в системе внутреннего подкрепления, опосредующей формирование алкогольной аддикции. Имеются сведения о наличии биохимических и молекулярно-генетических изменений в NAc при длительном употреблении алкоголя, однако ключевые механизмы, опосредующие это остаются не изученными. Есть сведения, что повышенная активность TLR4-сигнализации служит причиной развития нейровоспалительных событий при хронической алко-

голизации в ряде структур головного мозга, однако в NAc эти события изучены недостаточно.

Цель и задачи. Оценить вклад TLR4-сигнализации в нейровоспаление при длительной алкоголизации и ее отмене в прилежащем ядре головного мозга, и произвести оценку воздействия азитромицина (AZM) на экспрессию исследуемых нами генов в эксперименте.

Материалы и методы. Моделирование хронической алкоголизации достигалась внутрижелудочным введением 20%-го раствора этанола (2 г/кг, ежедневно) в контрольной и экспериментальной группах в течение 1 мес. По окончании алкоголизации, животным три дня в полость желудка вводили AZM (40 мг/кг, 160 мг/кг). Крысам контрольной группы вводили соответствующий объем во-

дного раствора. Образцы мозга изымали на 7-е сутки отмены алкоголя. Суммарная РНК получена с помощью Extract RNA. ОТ выполнена посредством «MMLV RT kit». Реал-тайм ПЦР проводили в смеси, содержащей SYBR Green MIX и смесь праймеров к целевым генам. Данные были обработаны методом $2^{-\Delta\Delta CT}$, использовали критерий достоверности Манна-Уитни.

Основные результаты. Длительная алкоголизация привела к повышению уровня мРНК TLR4 в прилежащем ядре мозга крыс (в 2,15 раза, $p \leq 0,05$), на 7-е сут. отмены алкоголя уровень мРНК оставался повышенным (в 1,22 раза, $p \leq 0,05$). В группе с AZM (40 мг/кг) наблюдалось снижение уровня мРНК TLR4 в 1,65 раза ($p \leq 0,05$) и в группе с AZM (160 мг/кг) снижение в 5,26 раза ($p \leq 0,05$). Аналогичные результаты были получены и отношении ключевых провоспалительных цитокинов. В группе длительной алкоголизации

и в группе отмены алкоголя был отмечен повышенный уровень экспрессии генов *Il1 β* и *Ccl2*, тогда как введение AZM привело к достоверному снижению уровня мРНК этих цитокинов. Кроме того, AZM оказал влияние на содержание мРНК IRF3 и Hmgb1. В нашем эксперименте на 7-е сут. отмены наблюдается пониженный уровень мРНК провоспалительных цитокинов IL4 и IL11, AZM продолжал снижать экспрессию этих генов.

Выводы. Полученные данные на модели хронической алкоголизации свидетельствуют о способности AZM вносить изменения дозозависимо в экспрессию генов TLR4-сигнализации в прилежащем ядре головного мозга крыс. В дальнейшем представляется интересным оценить уровень содержания белков к соответствующим мРНК методом ИФА, а также произвести наблюдения на разных сроках отмены длительной алкоголизации.

КОСВЕННОЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗЛОУПОТРЕБЛЕНИЯ СОЛЯМИ КОБАЛЬТА И ИНЕРТНЫМ ГАЗОМ КСЕНОНОМ ПО ЦИРКУЛИРУЮЩИМ МИКРОРНК КРОВИ В ЦЕЛЯХ ДОПИНГ-КОНТРОЛЯ

Пронина И.В.^{1,2}, Мочалова Е.С.¹, Постников П.В.¹

1 Национальная антидопинговая лаборатория (институт) Московского государственного университета им. М.Ю. Ломоносова, Москва, РФ;

2 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, РФ.

Косвенная детекция активаторов гипоксия-индуцируемого фактора (HIF), к которым относятся соли кобальта и ксенон, возможна по изменению параметров крови (процентного содержания ретикулоцитов (RET%), содержанию гемоглобина (HGB), гематокриту (HCT) и т.д.) при общем клиническом анализе. Однако, одинаковую картину изменений дают все стимуляторы кроветворения, не только HIF-активаторы, что затрудняет выбор дальнейшего метода исследования пробы спортсмена на допинг.

Кобальт имитирует состояние гипоксии, препятствуя деградации α -субъединицы гипоксия-индуцируемого фактора (HIF-1 α), что приводит к увеличению синтеза гормона эритропоэтина. Ксенон стимулирует синтез эритропоэтина через активацию выработки HIF-1 α .

Целью нашего исследования было количественное определение циркулирующих в плазме крови микроРНК, задействованных в сигнальных путях HIF, ответе на гипоксию и стимуляции эритропоэза как потенциальных маркеров злоупотребления запрещенными в спорте стимуляторами эритропоэза.

В исследовании участвовали 20 добровольцев: 10 добровольцев принимали биодобавку «Кобальт DS®» (Dr. Skalny, Россия) в течение 20 дней, 10 добровольцев вдыхали смесь ксенона и кислорода в пропорции Xe/O₂ 25:75 (v/v). Кровь отбирали до приема препарата и по окончании цикла приема утром натощак, после отбора кровь сразу центрифугировали для получения плазмы. Выделение микроРНК из плазмы крови проводили при помощи

набора PAXgene Blood miRNA Kit (Qiagen, США). Обратную транскрипцию проводили с помощью наборов miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, США). Количественную ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96 Bio-Rad (США) с помощью наборов miRCURY® LNA® miRNA SYBR® Green PCR Kit и панелей для исследования профилей экспрессии зрелых микроРНК, участвующих в ответе на гипоксию miRCURY LNA™ miRNA Focus Panel (Qiagen, США).

Нами исследовано 84 микроРНК, составляющих панель гипоксии miRCURY LNA™ miRNA Focus Panel. Статистический анализ результатов исследования в программах CFX Maestro Software (Bio-Rad, США) и GeneGlobe (Qiagen, Германия) показал, что уровень экспрессии hsa-miR-15b-5p возрастает в 6,89 раз ($p < 0,05$) при приеме препаратов кобальта, но не изменяется при ингаляциях ксенона; уровни экспрессии hsa-miR-378a-3p и hsa-miR-491-5p возрастают в 60-70 раз ($p < 0,05$) при ксеноновых ингаляциях, но не изменяются при приеме солей кобальта. Ранее нами показано, что уровни данных микроРНК не изменяются при возникновении физиологической гипоксии.

Таким образом, нами предлагается три потенциальных микроРНК-маркера для косвенного дифференциального определения злоупотребления солями кобальта и ксеноном. Уровень микроРНК hsa-miR-15b-5p в плазме крови увеличивается при приеме препаратов кобальта, а уровни hsa-miR-378a-3p и hsa-miR-491-5p — при ксеноновых ингаляциях.

Ключевые слова: ксенон, кобальт, микроРНК, допинг-контроль, стимуляторы эритропоэза.

ПРИМЕНЕНИЕ ДАННЫХ ОБ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТАРНЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ПРЕДИКЦИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ С ПОЗДНО МАНИФЕСТИРУЮЩИМИ РАССТРОЙСТВАМИ ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Савушкина О.К., Бокша И.С., Шешенин В.С., Почуева В.В., Прохоров Т.А., Терешкина Е.Б., Воробьева Е.А., Бурбаева Г.Ш.

ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Актуальность. Многочисленные исследования в области патогенеза шизофрении демонстрируют разнообразие биологических механизмов, участвующих в развитии этого заболевания. Активно разрабатывается глутаматергическая гипотеза патогенеза шизофрении, предполагающая нарушение глутаматной нейромедиаторной системы, которая была дополнена данными о нарушении глутаматного метаболизма. Также получены данные о нарушении при шизофрении равновесия активности прооксидантной и антиоксидантной систем и особенно вовлечения нарушений глутатион-зависимой антиоксидантной системы в патогенез заболевания.

Пожилые пациенты с шизофреноподобными психозами с поздним началом не образуют клинически однородной группы — на гетерогенность указывают результаты психопатологических, нейровизуализационных и нейропсихологических исследований. Это подтверждает актуальность исследования биохимических параметров крови таких пациентов для их дифференциации и разработки персональных фармакотерапевтических подходов, а также прогноза действия терапии.

Цель настоящего исследования — оценка клинико-биологических корреляций у больных с поздно манифестирующими расстройствами шизофренического спектра в тромбоцитах периферической крови с точки зрения их пригодности для предикции эффективности антипсихотической терапии. Задачи исследования решались путем определения активности ферментов глутаматного (глутаматдегидрогеназы, ГДГ), глутатионного (глутатионредуктазы, ГР и глутатион S-трансферазы, ГСТ) и энергетического метаболизма (цитохром с-оксидазы, ЦО) в тромбоцитах крови.

Материал и методы. В исследование были включены 62 пациента (женщины) в возрасте 50-89 лет (медиана 65,5 года [58; 76]) с поздно манифестирующими (после 40 лет) психозами шизофренического спектра: (F20.0, F25, F22.0, F06.2 по МКБ-10). Оценка состояния больных и взятие крови для определения активности ферментов проводились перед началом курса фармакотерапии (базовые уровни активности ферментов) и на 28-й день терапии с использованием шкалы позитивных и негативных синдромов (PANSS). В качестве критериев оценки эффективности использовалось изменение среднего суммарного балла шкалы PANSS к 28 дню терапии, разделенное на начальное значение, выраженное в %.

Критериями исключения являлись: наличие иных психических и неврологических заболеваний, деменций различной этиологии, травм головного мозга, тяжелых соматических заболеваний в стадии декомпенсации.

Контрольную группу составили 37 женщин в возрасте 50-84 лет (медиана 59 лет[53; 63]) без психических и неврологических заболеваний.

Тромбоциты выделяли из образцов венозной крови, взятой в вакутейнеры с 3,2% цитратом натрия, активности ферментов ГДГ, ГР, ГСТ, ЦО определяли спектрофотометрическими кинетическими методами с использованием планшетного спектрофотометра xMark (Bio-Rad) как описано ранее [Терешкина и др., 2019].

Статистический анализ базы данных проводили с использованием модуля “непараметрический анализ” программы Statistica 8.0 (StatSoft). Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В контрольной группе обнаружена корреляция между уровнями активности ГДГ и ГСТ ($R=0,49$, $p=0,002$).

В структуре выборки пациентов для каждого из показателей (базовые значения ферментативные активности) наблюдалась значительная вариабельность значений, что послужило основанием для кластеризации пациентов. Для кластеризации базовые значения активности фермента, были нормированы путем деления индивидуальных значений на соответствующие каждому ферменту максимальные значения в обследованной группе пациентов. В результате кластеризации методом каппа-средних с заранее заданным числом кластеров, равным 2, числом итераций, равным 1 получены кластер 1 ($n=40$) и кластер 2 ($n=22$).

В полученных кластерах выявлены разные взаимосвязи между анализируемыми параметрами. В K1 обнаружены корреляции между базовыми (на начало лечения) уровнями активности ферментов ЦО и ГСТ ($R=0,450$, $p=0,004$), ГДГ и ГСТ ($R=0,512$, $p=0,001$). В K2 взаимосвязей между ферментами не выявлено.

Также выявлены корреляции между базовыми уровнями активности и степенью редукции по шкале PANSS (которая расценивалась как эффективность терапии).

Так, в K1 активность ГР положительно коррелировала со степенью редукции по подшкале позитивных симптомов PANSS-Pos ($R=0,418$, $p=0,007$), подшкале общей психопатологии PANSS-Psy ($R=0,424$, $p=0,006$), и сумме баллов PANSS ($R=0,445$, $p=0,004$), а уровень активности ГСТ — по подшкале PANSS-Psy ($R=0,315$, $p=0,048$).

Так, в K2 активность ГДГ отрицательно коррелировала со степенью редукции по подшкале позитивных симптомов PANSS-Pos ($R=-0,532$, $p=0,011$) и сумме баллов PANSS ($R=-0,493$, $p=0,020$).

Закключение. Выявлена гетерогенность базовых (до курса антипсихотического лечения) уровней активности

тромбоцитарных ЦО, ГДГ, ГР и ГСТ у женщин с поздно манифестирующей шизофренией, что указывает на перспективность определения активности тромбоцитарных ферментов глутаматного, глутатионового и энергетического обмена при шизофрении с поздней манифестацией.

Результаты исследования показали наличие статистически значимых корреляций между уровнями измеренных базовых активностей тромбоцитарных ферментов и параметрами, отражающими эффективность фармакотерапии, но эти связи обнаружены только в подгруппах пациентов, предварительно выделенных путем кластеризации. Совершенствование дифференциальной диагностики расстройств шизофренического спектра в позднем возрасте и выделение относительно более гомогенных подгрупп

пациентов с использованием биологических (параклинических) методов обследования создает перспективы разработки эффективных методов профилактики и лечения психозов. Анализ активности ферментов энергетического и глутаматного метаболизма, а также глутатион-зависимых ферментов в форменных элементах крови, особенно тромбоцитах, позволяет получить дополнительные сведения об этиологии и патогенезе патологии и подойти к разработке персонализированного подхода к ведению пациентов с поздней шизофренией. Накопление и анализ данных об изменении активности ферментов энергетического и глутаматного метаболизма, антиоксидантных ферментов при расстройствах шизофренического спектра важно для оценки и понимания особенностей течения

СОПОСТАВЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА МЕТОДАМИ 16S NGS И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР-РВ

Злобовская О.А., Дементьева Е.В., Курносов А.С., Глазунова Е.В., Макаров В.В., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва

Введение. По мере увеличения базы знаний о взаимосвязи между таксономическим составом микробиоты и состоянием здоровья, возникает интерес к точной диагностике отдельных микроорганизмов. Одним из наиболее точных методов оценки содержания ДНК является количественная ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ); однако наиболее широко используемым подходом к изучению разнообразия и состава микроорганизмов в человеческом организме является секвенирование фрагмента гена 16S рРНК. Данный метод позволяет определить относительное присутствие идентифицируемых таксонов. При этом, имея информацию о общей бактериальной массе, можно рассчитать абсолютное содержание таксонов в образце.

Цель и задачи исследования. В связи со множеством этапов, на которых могут возникнуть искажения, и уникальными характеристиками каждого этапа секвенирования гена 16S рРНК, мы провели исследование, чтобы узнать, насколько оценка данным методом сопоставима со стандартным количественным методом — количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для этого были поставлены следующие задачи:

— оценить таксономический состав микробиоты кишечника пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями методом NGS 16S в зависимости от используемого метода выделения

— оценить количество ДНК определенных таксономических групп у данных пациентов методом количественной ПЦР-РВ в зависимости от используемого метода выделения

— сопоставить полученные результаты.

Материалы и методы. Биоматериал: фекалии пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (группа «хроническая сердечная недостаточность» и группа «атеросклероз») и пациентов контрольной группы.

Экстракция ДНК из фекалий: наборы QIAamp — Fast

DNA Stool Mini Kit и PowerFecal DNA Kit (Qiagen). Набор PowerFecal отличается от FastStool наличием стадии механической гомогенизации образца для увеличения выхода ДНК грамположительных микроорганизмов.

Анализ методом NGS: регионы V3-V4 гена 16S рРНК (MiSeq, Illumina, v3). Для анализа использовали пакет QIIME2 v 2022.2.0. Последовательности, прошедшие контроль качества (по 19 тысяч на образец), классифицировали по базам данных SILVA и RDP.

Анализ ПЦР-РВ проводили для: семейств Christensenellaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae; родов *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp., *Odoribacter* sp., *Oscillibacter* sp., *Ruminococcus* sp., *Subdoligranulum* sp.; видов *Enterococcus faecalis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, а также определяли общее бактериальное число по амплификации консервативного участка гена 16S рРНК.

Данные NGS были пересчитаны из относительного содержания таксонов в абсолютное по формуле $\frac{N_{\text{такс}}}{N_{\text{общ}}} * \text{ОБЧ}$, где $N_{\text{такс}}$ — количество прочтений соответствующего таксона в образце; $N_{\text{общ}}$ — общее количество прочтений для образца; ОБЧ — рассчитанное по данным ПЦР-РВ общее бактериальное число для образца. Полученные абсолютные данные использовали для прямого сопоставления с результатами ПЦР-РВ.

Статистическую оценку проводили на языке Python. Для оценки корреляции пересекающихся таксонов между примененными методиками был использован метод Спирмена. Для определения точности количественной оценки применили модели машинного обучения: линейный дискриминантный (ЛДА) и многокомпонентный (МГК) анализы.

Основные результаты. Относительное содержание некоторых таксонов для метода NGS существенно отличалось в зависимости от используемой базы данных (SILVA или RDP). Ряд таксонов был определен только по одной из двух баз; а для некоторых общих таксонов количество прочте-

ний, которое определялось в одной базе, значительно отличалось от другой. Эта разница повлияла и на способность предсказывать метод выделения: данные, полученные по базе RDP, привели к лучшей эффективности обучения ЛДА, чем данные, полученные по базе SILVA. Значимая корреляция (коэффициент Спирмена более 0.45) между данными NGS и ПЦР-РВ наблюдалась в случае тех таксонов, для которых при этом была и максимальная корреляция между базами NGS (таксоны *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp., *Odoribacter* sp.).

При сравнении эффективности обучения моделей на основе данных NGS и ПЦР-РВ, точность предсказания метода выделения с помощью линейного дискриминантного анализа оказалась выше при обучении на данных ПЦР-РВ, чем на данных NGS. При использовании многокомпонентного анализа на основе результатов ПЦР-РВ образцы, выделенные разными методами, удалось различить по обеим главным компонентам; но при оценке методом NGS различия по первой главной компоненте не были обнаружены. Как результат, оба подхода показали повышенную точность предсказания на основе информации, получен-

ной на данных ПЦР-РВ. При этом в случае ПЦР-РВ использовалось лишь 11 таксонов, в то время как при применении NGS было задействовано более 130 таксонов.

Заключение/выводы. Снижение точности количественной оценки с использованием метода 16S NGS может быть обусловлено применением универсальных вырожденных праймеров для амплификации всех таксонов, ограниченной длиной региона для таксономической идентификации (например, при использовании регионов V3-V4, рекомендуется идентификация до уровня семейств) и неточностями в базах данных. Однако метод 16S NGS все же целесообразно использовать как первичную оценку таксономического состава. Более высокую предсказательную способность продемонстрировали модели, обученные на результатах базы RDP.

Для более точной количественной оценки и в роли дополнительного подтверждающего метода, особенно при определении наличия корреляционной зависимости между исследуемыми группами, для таксонов, выявленных с помощью 16S NGS, рекомендуется проводить анализ содержания ДНК методом ПЦР-РВ.

ЧАСТЬ 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ А-КЕТОГЛУТАРАТА И А-КЕТОГЛУТАРАМАТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И В ОРГАНАХ КРЫС В РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Шурубор Е.И., Юдин В.С., Кескинов А.А., Красников Б.Ф.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России

Введение. Развитие гепатоэнцефалопатии (ГЭ) приводит к сбою в работе печени и других органов, дисбалансу энергетических метаболитов цикла трикарбонных кислот (ЦТК) и глутамин-глутаматного цикла (Глн-Глу). Для создания модели крыс с ГЭ часто применяют тиоацетамид (ТАА). Патология, возникающая при однократной интоксикации организма (острая ГЭ), как правило, обратима и характеризуется полным восстановлением клеток печени через ~72 часа [1]. Хроническая ГЭ встречается у больных с алкогольным или токсическим циррозом печени, сопровождается серьезными неврологическими расстройствами и зачастую необратима. Диагностика ГЭ и мониторинг восстановления заболевания обычно осложнены отсутствием приемлемых биомаркеров. Анализ широкого круга метаболитов в образцах контрольных и ТАА-индуцированных крыс с различными формами ГЭ позволил выявить два метаболита: α-кетоглутарат (αКГ) и α-кетоглутарамат (αКГМ), которые могут быть полезны для оценки степени развития ГЭ. Как известно, αКГМ является промежуточным продуктом Глн-Глу цикла (путь глутаминазы II), а αКГ и аммиак, конечными. На изменение уровней αКГ и αКГМ в образцах крыс, а также их соотношений (αКГ/αКГМ) влияет степень развития ГЭ (статья в процессе подготовки). Проведен сравнительный анализ распределения αКГ и αКГМ в плазме крови, тканях печени, почек и мозга контрольных и ТАА-индуцированных крыс в моделях животных с хронической ГЭ и «выздоро-

вающих» после развития острой ГЭ. Полученные результаты указывают, что несмотря на декларируемое полное восстановление клеток печени крыс спустя 72 часа после интоксикации, на метаболомном уровне в тканях печени и мозга крыс, перенесших острую ГЭ, дисбаланс в содержании αКГ и αКГМ по истечении 6 дней, сохранялся. Полученные данные дают представление о трендах по деградации и стабилизации метаболических процессов в органах крыс в условиях развития хронической ГЭ, а также после их «восстановления» от острой интоксикации и могут быть полезны для прогностических и/или терапевтических целей.

Цель работы. Выявление биомаркеров ЦТК и Глн-Глу цикла для определения статуса ГЭ

Задачи. Задачи исследования включали: (а) создание ТАА модели крыс с острой и хронической ГЭ; (б) подтверждение степени развития хронической ГЭ и реабилитации крыс после развития острой ГЭ; (с) определение уровней метаболитов ЦТК, αКГ и αКГМ в образцах крыс.

Материалы. В обоих экспериментах участвовали белые лабораторные крысы линии Wistar, самцы, возраст 2 месяца, вес 140-150 г. В модели развития хронической ГЭ продолжительностью 2-22 недели, крысы принимали питьевую воду с добавлением ТАА в концентрации 0.4 г/л. Всего участвовали 26 контрольных и 55 ТАА-индуцированных крыс. Развитие хронической ГЭ было подтверждено на морфологическом и гистологическом уровнях срезов

тканей органов крыс. Острая форма развития ГЭ была получена в результате однократного внутривенного введения ТАА в дозах 0, 200, 400 и 600 мг/кг. Контрольная группа состояла из 3-х крыс, ТАА-индуцированные группы из 13 крыс (2 крысы с дозой ТАА 600 мг/кг не выжили). Образцы крыс с острой ГЭ были собраны спустя 6 суток после интоксикации, предположительно, после полного их восстановления. Всего в группе крыс с хронической ГЭ было проанализировано 320 образцов плазмы крови, тканей печени, почек и мозга, и в группе крыс с острой ГЭ 72 образца.

Методы. Для анализа метаболитов ЦТК, αКГ и αКГМ был использован метод ВЭЖХ-УФ анализа [2]. Статистическая обработка данных была выполнена с помощью процедуры Бенджамини–Хохберга, тестов Бартлетта и Шапиро–Уилка.

Основные результаты. Анализ распределения αКГ и αКГМ в плазме крови и тканях органов крыс выявил заметные различия между рассматриваемыми группами (Табл. 1). Как следует из представленных данных, уровни αКГ и αКГМ существенно различались между группами

крыс с хронической ГЭ и крысами, реабилитированными после острой интоксикации. Так, если уровни αКГ в плазме крови и тканях органов крыс с хронической ГЭ возрастали относительно контрольных значений, то уровни αКГМ снижались. У крыс «восстановленных» после перенесенной острой ГЭ наблюдалась иная картина: в плазме крови и тканях почек крыс уровни обеих кетокислот синхронно снижались относительно контроля, тогда как паттерны распределения αКГ и αКГМ в тканях печени и мозга совпадали с таковыми при хронической ГЭ. Данное обстоятельство опровергает утверждение о том, что полное обновление клеток печени крыс на 3-й день эксперимента свидетельствует о полном их восстановлении после развития острой ГЭ. Уровни распределения αКГ и αКГМ в рассматриваемых образцах крыс данное обстоятельство не подтверждают (см. Табл. 1). Соотношение метаболитов αКГ/αКГМ также указывает на то, что восстановление различных органов крыс после интоксикации происходит с различной скоростью: плазма крови и почки крыс восстанавливаются быстрее, чем ткани печени и мозга.

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ αКГ И αКГМ (СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ ± СТАНДАРТНОЕ ОТКЛОНЕНИЕ) В ПЛАЗМЕ КРОВИ, ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ, ПОЧЕК И МОЗГА КОНТРОЛЬНЫХ И ТАА-ИНДУЦИРОВАННЫХ КРЫС.

	Плазма крови ¹		Печень ²		Почки ²		Мозг ²	
	Контроль	ГЭ	Контроль	ГЭ	Контроль	ГЭ	Контроль	ГЭ
Острая ГЭ (период восстановления после однократной интоксикации)								
αКГ	1,84 ± 0,38	0,96 ± 0,45	0,08 ± 0,02	0,41 ± 0,19	0,14 ± 0,18	0,08 ± 0,05	0,05 ± 0,07	0,10 ± 0,04
αКГМ	18,88 ± 1,20	15,67 ± 3,49	1,64 ± 0,39	0,81 ± 0,29	0,11 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02
αКГ/αКГМ	0,10	0,06	0,05	0,51	1,27	2,66	1,25	3,33
R	0,6		10,2		2,1		2,6	
Хроническая ГЭ								
αКГ	2,80 ± 2,56	19,07 ± 7,09	0,001 ± 0,0001	0,01 ± 0,001	0,22 ± 0,36	0,40 ± 0,45	0,005 ± 0,006	0,007 ± 0,006
αКГМ	21,2 ± 6,37	9,7 ± 4,51	0,80 ± 0,20	0,71 ± 0,16	0,29 ± 0,07	0,12 ± 0,04	0,30 ± 0,22	0,23 ± 0,05
αКГ/αКГМ	0,13	1,97	0,001	0,014	0,76	3,33	0,016	0,030
R	15,2		14,0		4,4		1,9	

¹– плазма крови, μМ;

²– ткани печени, почек и мозга, нмоль/мг сырой ткани;

R – кратность соотношения уровней αКГ/αКГМ в образцах крыс с ГЭ по отношению к контрольным;

Заключение. Распределение метаболитов αКГ и αКГМ, а также их соотношения в плазме крови и тканях органов крыс способны отражать как тяжесть заболевания, так и степень восстановления органов после перенесенного ими заболевания печени.

Литература:

1. Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A, Cascales M. Relationship between genomic DNA

ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* 1993; 18(4):912-918.

2. Shurubor YI, Cooper AJ, Isakova EP, Deryabina YI, Beal MF, Krasnikov BF. Simultaneous determination of tricarboxylic acid cycle metabolites by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Anal Biochem.* 2016; 503:8-10.

PART 3. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE α -KETOGLUTARATE AND α -KETOGLUTARAMATE DISTRIBUTION IN THE BLOOD PLASMA AND ORGANS OF RATS IN VARIOUS MODELS OF HEPATOENCEPHALOPATHY

Shurubor E.I., Yudin V.S., Keskinov A.A., Krasnikov B.F.

Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia

Introduction. The development of hepatoencephalopathy (HE) leads to a malfunction of the liver and other organs, an imbalance of energy metabolites of the tricarboxylic acid cycle (TCA) and glutamine-glutamate cycle (Gln-Glu). Thioacetamide (TAA) is often used to create a rat model with GE. The pathology that occurs with a single intoxication of the body (acute HE) is usually reversible and is characterized by complete recovery of liver cells after ~72 hours [1]. Chronic HE occurs in patients with alcoholic or toxic liver cirrhosis, is accompanied by serious neurological disorders and is often irreversible. Diagnosis of HE and monitoring of disease recovery is usually complicated by the lack of acceptable biomarkers. Analysis of a wide range of metabolites in samples of control and TAA-induced rats with various forms of HE revealed two metabolites: α -ketoglutarate (α KG) and α -ketoglutaminate (α KGM), which may be useful for assessing the degree of development of HE. As is known, α KGM is an intermediate product of the Gln-Glu cycle (glutaminase II pathway), while α KG and ammonia are final products. Changes in the levels of α KG and α KGM in rat samples, as well as their ratios (α KG/ α KGM) are influenced by the degree of development of HE (article in preparation). A comparative analysis of the distribution of α KG and α KGM in the blood plasma, tissues of the liver, kidneys and brain of control and TAA-induced rats in animal models with chronic HE and "recovered" after the development of acute HE was carried out. The obtained results indicate that despite the declared complete recovery of rat liver cells 72 hours after intoxication, at the metabolomic level in the liver and brain tissues of rats that underwent acute HE, the imbalance in the content of α KG and α KGM after 6 days persisted. The data obtained give an idea of the trends in the degradation and stabilization of metabolic processes in the organs of rats under the conditions of the development of chronic HE, as well as after their "recovery" from acute intoxication, and may be useful for prognostic and/or therapeutic purposes.

The purpose of the work: Identification of biomarkers of the TCA and Gln-Glu cycle to determine the status of HE.

Objectives. The objectives of the study included: (a) creation of a TAA model of rats with acute and chronic HE; (b) confirmation of the degree of development of chronic HE and rehabilitation of rats after the development of acute HE; (c) determination of the levels of TCA metabolites, α KG and α KGM in rat samples.

Materials. Both experiments involved white Wistar laboratory rats, male, 2 months old, weight 140-150 g. In the chronic HE development model lasting 2-22 weeks, rats took drinking water supplemented with TAA at a concentration of 0.4 g/l. A total of 26 control and 55 TAA-induced rats were used. The development of chronic HE was confirmed at the morphological and histological levels of tissue sections of rat organs. The acute form of HE was obtained as a result of a single intraperitoneal injection of TAA at doses of 0, 200, 400, and 600 mg/kg. The control group consisted of 3 rats, TAA-induced groups of 13 rats (2 rats with a dose of TAA 600 mg/kg did not survive). Samples of rats with acute HE were collected 6 days after intoxication, presumably after their complete recovery. In total, 320 samples of blood plasma, liver, kidney and brain tissues were analyzed in the group of rats with chronic HE, and 72 samples in the group of rats with acute HE.

Methods. HPLC-UV analysis was used to analyze the TCA metabolites, α KG and α KGM [2]. Statistical data processing was performed using the Benjamini-Hochberg procedure, Bartlett and Shapiro-Wilk tests.

Main results. Analysis of the distribution of α KG and α KGM in the blood plasma and tissues of the organs of rats revealed significant differences between the groups under consideration (Table 1). As follows from the presented data, the levels of α KG and α KGM differed significantly between groups of rats with chronic HE and rats rehabilitated after acute intoxication. So, if the levels of α KG in the blood plasma and tissues of the organs of rats with chronic HE increased relative to the control values, then the levels of α KGM decreased. In rats "recovered" after acute HE, a different picture was observed: in the blood plasma and kidney tissues of rats, the levels of both keto acids synchronously decreased relative to the control, while the patterns of distribution of α KG and α KGM in liver and brain tissues coincided with those in chronic HE. This circumstance refutes the statement that the complete renewal of rat liver cells on the 3rd day of the experiment indicates their complete recovery after the development of acute HE. The distribution levels of α KG and α KGM in the examined rat samples do not confirm this circumstance (see Table 1).

TABLE 1. α KG AND α KGM LEVELS (MEAN \pm STANDARD DEVIATION) IN BLOOD PLASMA, LIVER, KIDNEY, AND BRAIN TISSUES OF CONTROL AND TAA-INDUCED RATS.

	Blood plasma ¹		Liver ²		Kidney ²		Brain ²	
	Control	HE	Control	HE	Control	HE	Control	HE
Acute HE (recovery period after a single intoxication)								
α KG	1.84 \pm 0.38	0.96 \pm 0.45	0.08 \pm 0.02	0.41 \pm 0.19	0.14 \pm 0.18	0.08 \pm 0.05	0.05 \pm 0.07	0.10 \pm 0.04
α KGM	18.88 \pm 1.20	15.67 \pm 3.49	1.64 \pm 0.39	0.81 \pm 0.29	0.11 \pm 0.04	0.03 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02

αКГ/αКГМ	0.10	0.06	0.05	0.51	1.27	2.66	1.25	3.33
R	0.6		10.2		2.1		2.6	
Chronic HE								
αКГ	2.80 ± 2.56	19.07 ± 7.09	0.001 ± 0.0001	0.01 ± 0.001	0.22 ± 0.36	0.40 ± 0.45	0.005 ± 0.006	0.007 ± 0.006
αКГМ	21.2 ± 6.37	9.7 ± 4.51	0.80 ± 0.20	0.71 ± 0.16	0.29 ± 0.07	0.12 ± 0.04	0.30 ± 0.22	0.23 ± 0.05
αКГ/αКГМ	0.13	1.97	0.001	0.014	0.76	3.33	0.016	0.030
R	15.2		14.0		4.4		1.9	

¹– blood plasma samples — μM;

²– tissues of the liver, kidneys and brain — nmol/mg of wet tissue;

R – multiplicity of the ratio of αКГ/αКГМ levels in samples of rats with HE in relation to the control;

The ratio of αКГ/αКГМ metabolites also indicates that the recovery of various organs of rats after intoxication occurs at different rates: the blood plasma and kidneys of rats recover faster than the tissues of the liver and brain.

Conclusion. The distribution of αКГ and αКГМ metabolites, as well as their ratios in blood plasma and organ tissues of rats, can reflect both the severity of the disease and the degree of recovery of organs after liver disease.

References:

1. Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A, Cascales M. Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* 1993;18(4):912-918.

2. Shurubor YI, Cooper AJ, Isakova EP, Deryabina YI, Beal MF, Krasnikov BF. Simultaneous determination of tricarboxylic acid cycle metabolites by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Anal Biochem.* 2016; 503:8-10.

CHROMOSOMAL MECHANISMS OF QUINOLONE-RESISTANT *SALMONELLA* ISOLATED IN VIETNAM

Suzhaeva L.V.¹, Truong N.Q.², Egorova S.A.¹, Makarova M.A.¹, Zhamborova M.H.¹, Starkova D.A.¹, Polev D.E.¹, Saitova A.T.¹

¹ St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

² Pasteur Institute in Ho Chi Minh City, Vietnam

Relevance. About 93.8 (95% CI: 61.8-131.6) million cases of non-typhoid *Salmonella* gastroenteritis are registered annually in the world, including 80.3 million food-borne cases, while 155 (95% CI: 39.0-303.0) thousand deaths. The main problem in treatment of salmonellosis is the resistance of *Salmonella* to the fluoroquinolones, the drugs of choice. The main mechanism of quinolone resistance in Enterobacteriaceae is the target modification — DNA gyrase and topoisomerase IV— due to chromosomal mutations in the Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) of the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes encoding these enzymes.

Objective. To characterize chromosomal mutations and their effect on the level of fluoroquinolone resistance in *Salmonella* isolated from various sources in the Socialist Republic of Vietnam.

Materials and methods. In total, 390 *Salmonella* isolates from humans, farm animals and animal food products in the Socialist Republic of Vietnam were studied. Quinolone-resistant isolates were screened by disco-diffusion method with nalidixic acid (30 mcg) and pefloxacin (5 mcg). In resistant isolates the minimum inhibitory concentration (MIC) of ciprofloxacin was tested by gradient diffusion method using E-tests (BioMerieux). Whole genome sequencing (WGS) of resistant

strains (MIC of ciprofloxacin >0.06 mg/L) by Illumina MiSeq platform. Data analysis for detection of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes was performed by ResFinder (Center for Genomic Epidemiology).

Results. Out of 390 *Salmonella* isolates 55.9% (218/390) were phenotypically determined as quinolone-resistant. Among 218 resistant isolates, 61.0% (133/218) had low-level quinolone resistance (MIC of ciprofloxacin 0.094-0.5 mg/l) and 39.0% (85/218) had high-level resistance (MIC > 0.5 mg/l) including 11.0% (24/218) with MIC > 32 mg/l.

According to WGS data of 54 quinolone-resistant *Salmonella* isolates, each isolate contained at least one chromosomal mutation in DNA gyrase and/or topoisomerase IV genes. Single nucleotide substitutions (SNPs) in DNA gyrase genes were detected in 42.6% (23/54) isolates: *gyrA* in 24.1% (13/54), *gyrB* in 3.7% (2/54), *gyrA* + *gyrB* in 14.8% (8/54). In topoisomerase IV genes SNPs were detected in 94.4% (51/54) of isolates: *parC* in 83.3% (45/54), *parC* + *parE* in 11.1% (6/54).

In *gyrA* gene several types of missense mutations in different codons have been identified: D87Y; D87G; D87N; S83F; S83Y; T661N; D759E. The most common *gyrA* mutations were amino acid substitutions in the QRDR codons 87 (29.6% (16/54)) and 83 (16.7% (9/54)), while in 13.0% (7/54) isolates

they were in combination with each other. For isolates with point mutations in 83 codon *gyrA* gene MIC of ciprofloxacin did not exceed 0.5 mg/l. For 88.9% (8/9) of isolates with point mutations in 87 codon *gyrA* MIC of ciprofloxacin did not exceed 1.5 mg/l. The MIC of ciprofloxacin for 71.4% (5/7) isolates with mutations in both 83 and 87 codons was > 32 mg/l. Interestingly, among three types of amino acid substitutions in 87 codon, the substitution of aspartic acid with glycine (D87G) was always in combination with the substitution of serine with phenylalanine (S83F) in 83 codon, and 83.3% (5/6) of these strains had MIC of ciprofloxacin > 32 mg/l. The substitution of aspartic acid with tyrosine (D87Y) has always been the only one, and for 77.8% (7/9) of these strains MIC of ciprofloxacin did not exceed 0.38 mg/l. In three strains combined single-nucleotide substitutions outside QRDR *gyrA* were revealed: T661N and D759E, MIC of ciprofloxacin did not exceed 0.75 mg/l.

As for the mutations in QRDR of *parC* gene, two types of SNPs — T57S and/or S80I — were found in 63% (34/54) of isolates. T57S was the single substitution in 79.4% (27/34) of these isolates and MIC of ciprofloxacin did not exceed 1.5 mg/l. S80I was not detected as single mutation, only in combination with T57S. Among these isolates, 79.4% (27/34) carried only T57S substitution, while S80I was detected only in combination with T57S. Combination T57S+S80I *parC* was detected in 20.6% (7/34) of isolates, always in combination with two amino acid substitutions in codons 87 and 83 of the *gyrA*, the MIC of ciprofloxacin for the most isolates (5/7) was extremely high (more than 32 mg/L).

The following mutation types were identified outside the QRDR *parC*: T255S; N395S; S469A; A620T. Singly and in combination with each other, they were found in 75.9% (41/54) of strains, while in 44.4% (24/54) they were combined with the

mutations in the QRDR *parC*. In 31.5% (17/54) of the strains, a combination of all four of these single-nucleotide substitutions was detected outside of combination with any other mutations in the DNA gyrase and topoisomerase IV genes. The MIC of ciprofloxacin of these isolates varied from 0.25 to 2 mg/l, exceeding 0.5 mg/l in 47% (8/17) of cases.

All mutations detected in the *gyrB* and *parE* genes were outside the QRDR and were mostly combined with mutations in the QRDR of *gyrA* and/or *parC*. Two types of amino acid substitutions were identified in the *gyrB* gene: Q624K (14.8%, 8/54) and T717N (3.7%, 2/54). Q624K was always found in combination with D87Y of *gyrA*, T717N was the only one in the DNA gyrase gene. Mutations in *parE* gene were detected in 11.1% (6/54) of the isolates: Q135R, P231L and S592N, and always in combination with mutations in the QRDR of *gyrA* and/or *parC*. The MIC of ciprofloxacin of these isolates varied from 0.19 to 0.75 mg/l.

Conclusions. In the Socialist Republic of Vietnam, quinolone resistance was detected in 56.0% of *Salmonella* isolated from humans, farm animals and animal food products. Resistant strains had at least one mutation in DNA gyrase and/or topoisomerase IV genes. Due to the wide variety of detected chromosomal mutations (16 variants) and the presence of other resistance mechanisms, including plasmid mediated, it is difficult to make a reliable conclusion about the effect of each specific amino acid substitution on the quinolone resistance level. However, an extremely high resistance level > 32 mg/l (detected in 6 *Salmonella* isolates) was mostly associated with the combination of four single-nucleotide substitutions in the DNA gyrase and topoisomerase IV genes (D87G and S83F in *gyrA*, and T57S and S80I in *parC*) detected in 5 isolates.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАБОРОВ ДЛЯ ПРЕДОБРАБОТКИ И ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК ИЗ ФЕКАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

Курносков А.С., Глазунова Е.В., Злобовская О.А., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Качество выделения ДНК из образцов оказывают значительное влияние на результаты анализа микробиома. Большинство протоколов существующих наборов для выделения ДНК в РФ используют предварительный этап получения бактериальной суспензии. Этот этап представляет собой предварительное встряхивание образца в физиологическом растворе, центрифугирование и отбор верхней части осадка. Данный процесс трудоёмкий и его результаты существенно зависят от человеческого фактора.

Чаще всего после данного этапа в наборах предусмотрен химический лизис клеток и последующая очистка ДНК различными методами (на колонках, различных сорбентах или с помощью преципитации). Однако, существуют методы дополнительной предобработки образцов: с использованием ферментативной обработки лизоцимом или механического дробления с мелкими частицами, которые увеличивают выход ДНК,

особенно из грамположительных бактерий и архей.

Цель и задачи. Целью данного исследования было сравнение 12 коммерчески доступных наборов для выделения ДНК из фекалий, отличающихся наличием или отсутствием стадии предобработки образца и основанных на различных методах сорбции ДНК для её последующей очистки. Мы сравнивали эффективность выделения бактериальной ДНК, проводя качественную и количественную оценку таксономического состава, а также оценивая общий выход ДНК и чистоту препарата от ингибиторов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. подготовить 46 независимых образцов фекалий для последующего выделения согласно протоколам к используемым наборам (см. таблицу 1);
2. выделить ДНК из фекалий данными наборами;
3. оценить результаты экстракции с использованием

ПЦР-РВ для оценки общей бактериальной ДНК, отдельных представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также контрольных образцов (контроли выделения и ингибирования).

Материалы и методы. Используемый биоматериал: 46 образцов фекалий, замороженные при -80°C сразу после сбора, а также положительные и отрицательные контроли выделения.

ПЦР-РВ. Для оценки выделения для ПЦР-РВ были использованы праймеры и флуоресцентные зонды типа TaqMan:

1. на консервативные участки гена 16S рРНК (для оценки общей бактериальной массы);
2. специфичные к фрагменту гена 16S рРНК представителей

грамположительных бактерий *Lactobacillaceae*, *Coprococcus* spp., *Streptococcus* sp., *Clostridium leptum*;

3. специфичные к фрагменту гена 16S рРНК грамотрицательных бактерий *Enterobacteriaceae*, *Akkermansia muciniphila*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*;

4. на внутренний контроль выделения и на контроль ингибирования.

Состав реакции: 5x MIX буфер (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России); деионизованная вода для ПЦР; концентрация олигонуклеотидов в реакции $-0.08-0.4$ мкМ каждого в зависимости от системы. Объем матрицы ДНК на старте — 5 мкл.

Программа ПЦР: 95°C — 15 мин, 45 циклов: (95°C — 15 сек, 60°C — 30 сек). Обработка результатов: MS Excel 2010.

ТАБЛИЦА 1. ИНФОРМАЦИЯ ОБ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ НАБОРАХ

Производитель	Набор	Метод предобработки	Метод выделения	Общий ранг
QIAGEN	QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit	Механическое дробление в составе набора	Колоночный	2
QIAGEN	QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit	—	Колоночный	5
Fractal Bio	ФБиоНуклео	Бактериальная суспензия	Колоночный	9
АмплиСенс	РИБО-сорб	Бактериальная суспензия	Сорбент	7
АмплиСенс	ДНК-сорб-В	Бактериальная суспензия	Сорбент	9
ЦСП ФМБА	Магно-Сорб-Комбо (ручное выделение)	Набор «ФекаБит-Макс» (мех. дробление)	Магнитный сорбент	2
ЦСП ФМБА	Магно-Сорб-Комбо (выделение на приборе AllSheng Auto-Pure 96)	Набор «ФекаБит-Макс» (мех. дробление)	Магнитный сорбент	3
ЛабПэк	НК-Магно	Бактериальная суспензия	Магнитный сорбент	4
РеалБест	РеалБест экстракция 100	Бактериальная суспензия	Магнитный сорбент	6
НекстБио	МагноПрайм ЮНИ	Бактериальная суспензия	Магнитный сорбент	8
ЦСП ФМБА	РИБО-преп	Набор ФекаБит-Макс (мех. дробление)	Преципитация	1
ДНК-Технология	ПРОБА НК плюс	Набор Проба Л (лизоцим)	Преципитация	4

Основные результаты. Для сравнения результатов были получены выходы в ГЭ/р-ции (геном эквивалента на грамм) по каждой системе, а затем результаты были пересчитаны с учетом объемов биоматериала на старте выделения, этапов протокола и объема элюции в ГЭ/г фекалии с допущением 100% КПД для каждого выделительного набора.

По полученным концентрациям (ГЭ/г) были присвоены «ранги». Ранги отражают место в рейтинге выделительных наборов по средней концентрации образцов для каждой исследуемой системы. Чем большее количество ГЭ выделяет набор, тем выше место в рейтинге по данной системе. Далее по каждому набору ранги для всех специфичных систем были суммированы — и сумме рангов также придан ранг, который отражен выше в табл. 1.

Также мы оценили количество образцов, для которых отсутствует результат амплификации. Чем больше таких образцов, тем выше потери при выделении набором:

Fast DNA Stool Mini Kit < PowerFecal Pro DNA Kit < РИБО-преп < Магно-Сорб-Комбо (автомат) < Магно-Сорб-Комбо (ручное выделение) < ПРОБА НК плюс < РИБО-сорб < РеалБест экстракция 100 < НК-Магно < МагноПрайм ЮНИ < ДНК-сорб-В < ФБиоНуклео.

Заключение/выводы

Наибольшую эффективность выделения ДНК (пересчет циклов в ГЭ/г) продемонстрировал комплект выделительного набора РИБО-преп в паре с набором для предобработки ФекаБит-Макс производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

ТБ-ИЗАТЕСТ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЁЗА МЕТОДОМ LAMP И ПЕРСПЕКТИВЫ ДИАГНОСТИКИ В ФОРМАТЕ POINT-OF-CARE

Шириков Ф.В.^{1,2}, Беспятых Ю.А.^{1,2}

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

² РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. Несмотря на успехи России в борьбе с туберкулёзом (ТБ), отмеченные Всемирной организацией здравоохранения исключением её из списка 30 стран с высоким бременем ТБ, проблема распространения и выявления новых случаев заболевания по-прежнему актуальна. Одной из возможных причин низкой аналитической специфичности существующих тест-систем является использование в качестве мишени мобильного генетического элемента IS6110, который иногда отсутствует в штаммах *Mycobacterium tuberculosis* и встречается в геномах нетуберкулёзных микобактерий (НТМ).

Цель и задачи. Цель настоящего исследования: разработать тест-систему для дифференциальной экспресс-диагностики и количественного анализа геномной ДНК бактерий вида *Mycobacterium tuberculosis* от штаммов НТМ методом LAMP. Решались задачи по поиску видоспецифичной, консервативной и однокопийной мишени в геноме *M. tuberculosis*, а также дизайну наборов праймеров и оптимизации условий амплификации.

Материалы и методы. Подбор гена-мишени осуществляли с применением базы данных NCBI Nucleotide, а дизайн праймеров выполняли с помощью программного обеспечения PrimerExplorer, NEB LAMP Primer Design Tool и MorphoCatcher. Для экспериментальной работы использовали ДНК-полимеразу *Bst* 2.0 WarmStart (NEB, США) и стандартные буферные растворы, поставляемые вместе с ферментом. В качестве лабораторного оборудования для оценки результатов амплификации использовали термоджиклер CFX96 Touch (Bio-Rad, США) и мобильный анализатор Изаскрин-8, разработанный в ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России (РЗН 2022/17322 от 24.05.2022).

Основные результаты. На основе технологии амплификации LAMP разработана тест-система ТБ-ИЗАТЕСТ (заявка в Роспатент на изобретение № 2022133809 от 22.12.2022), позволяющая выявлять в образце геномной ДНК *M. tuberculosis* до 40 геном-эквивалентов за 15 минут. Эффективность амплификации: 152.4% ($R^2 = 0.977$). Тщательная оптимизация условий амплификации позволила добиться полного отсутствия неспецифической фоновой амплификации в отрицательных контролях без матрицы. Экспериментальная проверка аналитической специфичности на гетерологичной геномной ДНК штаммов НТМ и бактерий других таксонов ($n = 16$) ложноположительных сигналов не выявила.

Заключение. Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 выявила проблему недостающей пропускной способности диагностических лабораторий, проводящих ПЦР-диагностику бактериальных и вирусных инфекций. Более того, чрезмерная нагрузка на лаборатории нанесла ущерб выявлению других инфекционных агентов, в том числе и *M. tuberculosis*. Доступный способ повышения пропускной способности заключается в применении технологий изотермической амплификации, среди которых перспективным оказался метод LAMP. Разработанная тест-система ТБ-ИЗАТЕСТ в настоящее время апробирована на классическом лабораторном оборудовании для проведения ПЦР в режиме реального времени и на платформе мобильного анализатора Изаскрин-8. Таким образом, практическое внедрение предлагаемой тест-системы позволит не только увеличить пропускную способность диагностических центров, но и способствует появлению мобильных пунктов диагностики там, где ПЦР не доступна.

ИММУННЫЙ СТАТУС ПАЦИЕНТОК В ПЕРИ- И ПОСТМЕНОПАУЗЕ, ЕСТЬ ЛИ РАЗЛИЧИЯ?

Аверьянова М.В.¹, Киселева В.В.^{1,2}, Вишнякова П.А.^{1,2}, Искусных М.Е.², Ельчанинов А.В.^{1,3}, Вторушина В.В.¹, Кречетова Л.В.¹, Фатхудинов Т.Х.^{2,3}, Юренева С.В.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов (РУДН)

³ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»

Введение. Известно, что снижение уровня половых гормонов с возрастом приводит к снижению функциональной активности иммунной системы, как у мужчин, так и у женщин. Важнейшим компонентом иммунного

старения является набор функциональных и структурных изменений, которые могут проявляться в виде снижения способности бороться с инфекцией, ослаблением реакции на вакцинацию, предрасположенностью к ау-

тоиммунным заболеваниям и конститутивным вялотекущим воспалением. Иммунологическое старение является следствием возрастных изменений в функции иммунных клеток и их субпопуляционного состава. Известно, что женские половые гормоны, а именно эстрогены, рецепторы к которым повсеместно экспрессируются на иммунных клетках, играют важную протективную роль в иммунной системе. Изучение изменений иммунных параметров крови у женщин в разные периоды репродуктивного старения является актуальной задачей на сегодняшний день. К настоящему моменту существует большое количество работ на тему старения иммунной системы, но тонкие механизмы происходящих с возрастом процессов до сих пор остаются неизвестными.

Цель. Сравнение параметров иммунной системы пациенток в период перименопаузы и постменопаузы.

Материалы и методы. Была проведена комплексная оценка параметров иммунной системы у 50-и женщин в пери- (n=22) и постменопаузе (n=28) в возрасте от 44 до 57 лет, обратившихся в отделение гинекологической эндокринологии «НМИЦ АГП» им. В.И. Кулакова» МЗ РФ. Производилась оценка иммунного статуса: содержание основных субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови — Th (Т-хелперы) (CD3+CD4+), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+), содержание В-лимфоцитов CD19+ и NK-клеток CD16+CD56+ методом проточной цитометрии; концентрация цитокинов и сигнальных молекул (IL-1 β ; IL-1ra; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-12 (p70); IL-13; IL-15; IL-17A; Basic FGF; Eotaxin; G-CSF; GM-CSF; IFN- γ ; IP-10; MCP-1 (MCAF); MIP-1 α ; MIP-1 β ; PDGF-BB; RANTES; TNF- α ; VEGF в плазме периферической крови методом мультиплексного анализа; процентное соотношение популяций классических (CD14++CD16-) и неклассических (CD14-CD16++) и промежуточных моноцитов (CD14+CD16++), положительных по маркерам CD86, CD80, CD163, CD206, а также моноцитов, положительных по маркерам HLA-DR, CD40 и CD11b.

В исследование не включали пациенток с ожирени-

ем (ИМТ ≥ 30 кг/м²), системными, онкологическими, аутоиммунными заболеваниями, а также острыми респираторными или обострением хронических заболеваний в течение последних 3-х месяцев, а также приемом менопаузальной гормональной терапии в течение последних 3-х месяцев.

Основные результаты. Сравнения иммунных параметров крови у пациенток в пери- и постменопаузе выявило следующее: уровень провоспалительного маркера MCP-1 достоверно повышался в постменопаузальном периоде (p= 0,022), по сравнению с женщинами в период перименопаузы. Уровень классических моноцитов (CD14++CD16-) был значимо выше у пациенток в перименопаузальном периоде (p= 0,005), а уровень неклассических моноцитов (CD14-CD16++) был выше у женщин в постменопаузе (p=0,034). При этом, отмечалось повышение уровня неклассических CD80+ (p= 0,031) и CD163+ (p= 0,048) моноцитов у женщин в перименопаузальном периоде. Также отмечалось повышение уровня CD3-CD19+HLA-DR+ лимфоцитов у женщин в постменопаузе (p=0,034).

Заключение. В нашей работе наблюдалось перераспределение иммунных параметров у женщин в зависимости от стадии репродуктивного старения, что сопровождалось изменением профиля экспрессии цитокинов, в частности повышением провоспалительных маркеров у пациенток в постменопаузе. У женщин в период постменопаузы увеличивалось количество В-лимфоцитов, что, предпологается, делает более напряженным иммунный ответ после выключения функции яичников. С учетом полученных данных, представляется интересным проведение дальнейших исследований по влиянию менопаузальной гормональной терапии на параметры иммунной системы для понимания актуального вопроса, можем ли мы замедлить или обратить вспять старение иммунной системы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ N 22-75-00048

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ: ПОИСК ВОЗМОЖНЫХ ФАКТОРОВ РИСКА

Лямцева А.К., Костюк С.А., Жевнеронок И.В., Полуян О.С.

Государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (ГУО «БелМАПО»), Минск, Республика Беларусь

Введение. В настоящее время отмечается рост частоты перинатальных поражений центральной нервной системы (ЦНС) у недоношенных детей гипоксического, инфекционного, геморрагического и метаболического генеза в нозологической структуре неонатального периода, что делает актуальным изучение патогенетических механизмов развития, а также клинических особенностей данной патологии у детей различного гестационного возраста. Доминирующими поражениями центральной нерв-

ной системы в перинатальном периоде у недоношенных детей, выступающими в качестве предикторов неврологических и психоречевых нарушений, являются внутрижелудочковые кровоизлияния и повреждение белого вещества головного мозга, включая его наиболее частую форму — перивентрикулярную лейкомаляцию. Изучение генетических факторов предрасположенности в развитии данной патологии может дать возможность разработать новые терапевтические и профилактические стратегии.

Цель исследования. Изучение молекулярно-генетических факторов риска неврологических нарушений у недоношенных детей с различным сроком гестации.

Материалы и методы. Лабораторные исследования проводились на базе группы ПЦР-диагностики Научно-исследовательской лаборатории Государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

В качестве биологического материала для выявления полиморфизма генов факторов свертывания крови *FII*, *FV*, *FVII* и *FXIII* использовали клеточную массу крови 32 недоношенных детей с поражением ЦНС различного генеза (перивентрикулярное кровоизлияние (ПВК), ВЖК, энцефалопатия новорожденного, угнетение ЦНС, церебральная депрессия), которые составили основную группу и 15 практически здоровых детей (контрольная группа).

Выделение ДНК из биологического материала проводили с использованием сорбции ДНК на поверхности мембраны специальной колонки (набор реагентов «АртДНК MiniSpin» («АртБиоТех», РБ). Полученную ДНК использовали для постановки TaqMan полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с применением наборов реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) для генов факторов свертывания крови *FII* (20210 G/A), *FV* (1691 G/A) («ВекторБест», РФ) и *FVII* (10976 G/A), *FXII* (13 G/T) («Синтол», РФ). Детекцию результатов по определению генотипов полиморфных генов проводили методом анализа кривых плавления продуктов ПЦР высокого разрешения с использованием амплификатора «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи программы «STATISTICA 8.0». Анализ категориальных признаков проводили с помощью критерия χ^2 -Пирсона (χ^2) в таблице сопряженности 2x2. При уровне значимости $p < 0,05$ различия считались статистически достоверными. Для описания частот выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения.

Результаты. На основании данных анамнеза гестационный возраст недоношенных детей основной группы варьировал от 28 и менее недель до 35-37 недель. В группу исследования было включено 15 девочек и 17 мальчиков. Признаки энцефалопатии были выявлены у 22 новорожденных недоношенных детей, синдром угнетения ЦНС у 7 (21,88%). ПВК 1, 3 и 4 степени тяжести отмечалось у 3 новорожденных, ВЖК 2 степени тяжести — у 1 недоношенного новорожденного. Признаки респираторного дистресс-синдрома были обнаружены у 11 недоношенных детей, дыхательная недостаточность наблюдалась у 59,38% обследованных детей (n=19).

В ходе анализа результатов, полученных при изучении частоты выявления полиморфизма 20210 G/A в гене *FII*, у обследованных детей основной группы доминирующим генотипом была нормальная гомозигота — GG (100%, n=32), гетерозиготный (GA) и мутантный (AA) генотипы не были выявлены. В биологическом материале детей контрольной группы полиморфизм 20210 G/A в гене *FII* не был выявлен. Статистический анализ с использованием крите-

рия χ^2 , не выявил ассоциации между распределением генотипов полиморфизма 20210 G/A гена *FII* и заболеванием ($p > 0,05$).

На следующем этапе нами были проведены молекулярно-генетические исследования по определению частоты генотипов полиморфизма гена *FV* 1691 G/A. У обследованных детей основной группы распространенность данного полиморфизма составила: нормальная гомозигота GG — 96,88% (n=31) случаев, гетерозигота GA — 3,12% (n=1) случаев. Мутантная гомозигота AA у обследованных детей не была выявлена. У детей контрольной группы в одном из образцов была выявлена гетерозигота GA (6,67%, n=1), нормальная гомозигота (GG) была доминирующим генотипом — 93,33% (n=14). Мутантный (AA) генотип не был выявлен. Статистический анализ позволил установить отсутствие взаимосвязи между присутствием различных генотипов полиморфизма 1691 G/A гена *FV* и заболеванием ($\chi^2=0,31$; $p=0,58$).

Генотипный профиль полиморфизма 10976 G/A гена *FVII* характеризовался следующим распределением: в основной группе GG (нормальная гомозигота) — 75% (n=24) случаев, гетерозигота GA — 18,75% (n=6) случаев; в контрольной группе GG — 80% (n=12) случаев, GA — 20% (n=3) случаев. В основной группе генотипный профиль характеризовался наличием мутантного (AA) генотипа у 2 детей (6,25%), в контрольной группе данный генотип не был выявлен. Ассоциации между присутствием полиморфного варианта 10976 G/A в гене *FVII* и заболеванием установлено не было ($p > 0,05$).

При проведении анализа результатов, полученных для полиморфизма 13 G/T гена *FXIII*, было установлено, что среди детей основной группы исследования преобладают носители гетерозиготного генотипа GT — 46,88% (n=15) случаев. Частота выявления нормальной гомозиготы (GG) составила 43,75% (n=14) случаев, мутантного генотипа (TT) — 9,37% (n=3) случаев. Среди детей контрольной группы распространенность полиморфизма 13 G/T гена *FXIII* составила: GG — 53,33% (n=8) случаев, GT — 46,67% (n=7) случаев. Мутантный (TT) генотип не был выявлен. Статистический анализ не выявил взаимосвязи данного полиморфизма 13 G/T гена *FXIII* с развитием заболевания ($p > 0,05$).

Выводы. Таким образом, при проведении анализа частоты выявления полиморфизмов генов факторов свертывания крови *FII* (20210 G/A), *FV* (1691 G/A), *FVII* (10976 G/A) и *FXII* (13 G/T) не выявлено статистически значимых различий между исследуемыми группами. Для определения молекулярно-генетических факторов риска формирования повреждения ЦНС и последующих неврологических нарушений у недоношенных детей необходимы дальнейшие популяционные исследования, целесообразно расширить выборку групп пациентов, а также изучить распространенность новых генетических маркеров.

Перинатальное повреждение головного мозга может быть результатом взаимодействия полиморфных генов, связанных с воспалительной реакцией и генетически-средовыми факторами. Дальнейший поиск и выявление наиболее значимых взаимодействий может открыть новые перспективы для разработки новых стратегий в лечении и реабилитации недоношенных новорожденных.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИГИПОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДИПЕПТИДА

Линькова Н.С.¹, Петухов М.Г.², Трофимова С.В.¹, Хавинсон В.Х.^{1,3}, Attieh K.⁴

¹ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

³ ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Medical Center «Dermapro» Beirut, Lebanon

Введение. На фармацевтическом рынке РФ лекарственный иммуномодулирующий препарат тимоген (пептид EW) известен, как дипептид, регулирующий реакции клеточного, гуморального иммунитета и неспецифическую резистентность организма. Кроме того, применение дипептида у пациентов с синдромом диабетической стопы способствует активации репаративных процессов в ишемизированных тканях, за счет снижения уровня уровня HIF1 α в плазме крови, и, как следствие, усиления оксигенации тканей. Улучшение трофики тканей у больных с синдромом диабетической стопы сопровождается эпителизацией язв и улучшением клинического течения заболевания [5]. Эти данные согласуются с результатами ранее проведенного экспериментального исследования. У крыс в модели стрептозотоцинового сахарного диабета пептид EW способствовал нормализации оксигенации тканей и снижению в них синтеза HIF1 α [4].

Цель работы: изучить молекулярные механизмы антигипоксического действия дипептида EW.

Материалы и методы исследования. С помощью методов молекулярного моделирования и докинга лигандов с использованием программы ICM-Pro (Molsoft LLC, США) и суперкомпьютерных технологий Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт» была проанализирована возможность взаимодействия пептида EW с участками двунитевой ДНК (днДНК) в классической линейной В-форме и имеющие все возможные комбинации нуклеотидных последовательностей длиной 4 пары нуклеотидных остатков [3]. Виртуальный скрининг исследуемых лигандов выполняли во внутреннем силовом поле ICM-Pro (ICMFF) [2] и алгоритма DockScan (Molsoft LLC). При расчетах осуществляли глобальную оптимизацию гибкого лиганда в силовом поле рецептора. С помощью метода Монте-Карло с дальнейшей локальной минимизацией энергии взаимодействия лиганда и рецептора [1] были получены наиболее низкоэнергетические структуры комплексов пептида EW и днДНК. Нуклеотидные последовательности, имеющие наиболее высокое сродство к пептиду EW использовались для поиска идентичных нуклеотидных последовательностей в промоторных участках ДНК различных вариантов гена HIF1A в базе данных PubMed.

Результаты исследования. Установлено, что пептид EW с высокой вероятностью может связываться с последовательностями днДНК GGAG, AGAC, CGCG, CGGG, CCGG, AGTC, CAGG, GGTG, AGGA, AGGT. Из всех перечисленных последовательностей днДНК наибольшую комплементарность к пептиду EW имеет GGAG.

При взаимодействии с участком днДНК GGAG пептид EW образует 4 межмолекулярные водородные связи со стороны малой бороздки с атомами азота в позициях гуанин G5, G6 и аденин A7. В промоторах второго (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_181054) и третьего вариантов гена (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001243084), кодирующего белок HIF1A у человека, были найдены последовательности днДНК, комплементарные пептиду EW по данным расчетов. Последовательность днДНК GGAG, комплементарная пептиду EW, один раз встречается в прямой последовательности промотора второго варианта гена HIF1A и 2 раза – в обратной последовательности. Также в прямой последовательности промотора второго варианта гена HIF1A найдена последовательность днДНК AGGA, комплементарная пептиду EW, и занимающая 9 место в таблице 3 по вероятности реализации ДНК-пептидных взаимодействий. В обратной последовательности промотора второго варианта гена HIF1A найдена последовательность днДНК CCGG, комплементарная пептиду EW, и занимающая 5 место в таблице 3 по вероятности образования комплекса днДНК-пептид EW. В промоторе третьего варианта гена, кодирующего белок HIF1A у человека, были найдены последовательности днДНК GGTG и AGTC, комплементарные пептиду EW. В первом варианте кодирующего белок HIF1A у человека, последовательностей днДНК, комплементарных пептиду EW, не выявлено.

Вывод. Таким образом, в основе клинической эффективности пептида EW у пациентов с диабетической стопой вероятно лежит его способность регулировать экспрессию гена и синтез белка HIF1 α .

Литература:

1. Abagyan R., Totrov M. Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins. *J. Mol. Biol.* 1994. 235: 983-1002.
2. Arnautova Y.A., et al. Development of a new physics-based internal coordinate mechanics force field and its application to protein loop modeling. *Proteins.* 2011. 79: 477-498.
3. Kolchina N., et al. Systematic search for structural motifs of peptide binding to double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 2019. 47: 10553-10563.
4. Trofimov A.V., et al. Medical preparation and method for enhancing tissue oxygenation in case of diabetic foot. USA Patent US 11,083,770. 10.08.2021.
5. Trofimova S., et al. Peptide Correction of Tissue Hypoxia in Diabetic Foot Syndrome. *EC Clinical and Medical Case Reports.* 2022. 5(5): 8-15.

АНАЛИЗ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Шанский Я.Д.¹, Комарова А.В.^{1,2}, Кузьменко Л. В.^{1,2}, Господарик А.В.¹, Есиев С.С.¹, Беспятых Ю.А.^{1,2}

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Центр молекулярной медицины и диагностики, Москва, Россия

² Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Актуальность. Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) представляют собой группу монокарбоновых кислот и являются основными метаболитами кишечной микрофлоры. Их уровень изменяется при метаболическом синдроме, функциональных расстройствах кишечника и некоторых видах злокачественных новообразований данной локализации, что делает КЦЖК ценными индикаторами состояния микробиоты кишечника [1]. В литературе имеются данные об эффективности восстановления кишечного дисбиоза путем трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ). По содержанию КЦЖК в кале реципиента и донора ТФМ можно судить о характере и глубине протекания дисбиотических нарушений, а также об эффективности ТФМ [2].

Цель. Целью исследования было определение содержания КЦЖК в образцах кала реципиента и донора ТФМ методом газожидкостной хроматографии.

Методы. Объектом исследования были образцы кала реципиентов с нарушениями микробиоты кишечника (n=22) и доноров (n=4) микробиоты.

КЦЖК экстрагировали из кала раствором хлороводородной кислоты (0.5 М). Качественный и ко-

личественный анализ КЦЖК, в связи с их летучестью, проводили методом газожидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием на газовом хроматографе «Кристалл 2000» («Хроматэк», Россия). Количественный анализ проводили методом внутреннего стандарта с использованием модельных смесей водных растворов КЦЖК и диоксана. Статистический анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, 2011, США); значимость различий средних значений измеряли по гетероскедастическому критерию Стьюдента, силу корреляции показателей — по коэффициенту линейной корреляции Пирсона.

В обеих группах были определены такие показатели как содержание (мкг/г) уксусной (C2), пропионовой (C3), масляной (C4), изомасляной (iC4), валериановой (C5), изовалериановой (iC5), капроновой (C6) кислот, их общее содержание, отражающее метаболическую активность кишечной микрофлоры, анаэробный индекс (АИ) и отношение суммарного содержания кислот с разветвленной цепью (изомеров) к кислотам с неразветвленной цепью (IsoCn/Cn).

ТАБЛИЦА. СРАВНЕНИЕ УРОВНЯ КЦЖК И СВЯЗАННЫХ С НИМИ ПАРАМЕТРОВ В КАЛЕ ДОНОРОВ И РЕЦИПИЕНТОВ МИКРОБИОТЫ

Группа	Доноры			Реципиенты			p	
	Хар-ка	Среднее	Медиана	Мин-Макс	Среднее	Медиана		Мин-Макс
Параметр	C2	15.73	15.53	1.68 – 30.21	4.76	2.83	0 – 22.97	0.004
	C3	6.10	4.75	0.78 – 14.11	2.30	1.27	0 – 7.52	0.035
	iC4	0.96	0.40	0.16 – 2.89	0.62	0.21	0 – 3.06	0.505
	C4	5.96	1.92	0.30 – 19.71	2.09	0.95	0 – 16.45	0.141
	iC5	1.64	0.68	0.27 – 4.91	0.81	0.34	0 – 2.83	0.208
	C5	1.28	0.92	0.17 – 3.10	0.70	0.11	0 – 3.66	0.359
	C6	0.70	0.46	0.10 – 1.79	0.59	0.11	0 – 3.1	0.832
	Общ. код.	32.37	24.25	4.26 – 76.72	11.88	6.43	0 – 45.27	0.021
	IsoCn/Cn	0.08	0.09	0.03 – 0.11	0.31	0.06	0 – 3.76	0.517
	АИ	0.75	0.81	0.28 – 1.12	1.61	0.46	0 – 18.81	0.614

Выводы. На основании полученных результатов показано, что общее содержание КЦЖК в группе доноров значительно выше этого показателя в группе ре-

ципиентов, особенно значимы различия в содержании уксусной и пропионовой кислот (p < 0.05). (таблица). Данная кислота является мажорной среди КЦЖК, и из-

менения пула последних, как правило, связано со смещением в сторону представленности других кислот. Уровни индивидуальных КЦЖК сильно коррелируют между собой в данной группе (R 0,80–1,00); корреляции большинства КЦЖК имеют статистически значимый характер ($p < 0.05$).

В группе доноров сильным является вклад каждой из отдельно взятых КЦЖК в общий пул кислот, а также сохраняется типичное для здорового человека соотношение уксусной, пропионовой и масляной кислот (примерно 60:20:20). Такой картины не наблюдается в группе реципиентов, что подтверждает изменение функционирования микробиоты кишечника реципиентов. Прочие КЦЖК (валериановая, изовалериановая, капроновая) являются минорными, однако их вклад в общий пул в группе доноров также статистически значим. Уровни индивидуальных КЦЖК в меньшей степени

коррелируют друг с другом, чем в группе доноров (значения коэффициента корреляции R более вариабельны, 0,06–0,98).

Ограниченное количество включенных в исследование образцов доноров ($n=4$) затрудняет точную оценку различий содержания других КЦЖК. Однако имеющиеся данные дают основание ожидать у доноров микробиоты более высокого уровня валериановой и изовалериановой кислот.

Работа выполнена при финансовой поддержке АНО «Московский центр инноваций в здравоохранении» (договор № 2412-31/22).

Список литературы:

1. Chambers E. S. et al. Current nutrition reports. 2018, 7, p.198-206.
2. Kim, K.-.; Lee, Y.; Chae, W.; Cho, J.-Y. Metabolites. 2022, 12, 525.

ПОЛИПЕПТИДНЫЙ КОМПЛЕКС ХРЯЕВОЙ ТКАНИ СНИЖАЕТ СИНТЕЗ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ СТАРЕНИИ ХОНДРОЦИТОВ

Мякишева С.Н.¹, Линькова Н.С.^{1,2}, Медведев Д.С.¹, Рыжак Г.А.¹

¹ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Провоспалительные цитокины IL-1 α и TNF- α , секретируются на ранних стадиях развития остеоартрита (ОА), приводят к прогрессированию этого ассоциированного с возрастом заболевания. IL-1 α и TNF- α продуцируются активированными хондроцитами, синовиоцитами и мононуклеарными клетками [3]. Экспрессия IL-1 α обнаружена на поверхности стареющих хондроцитов и коррелирует с повышением синтеза других факторов, формирующих фенотип этих клеток, ассоциированный со старением [4]. Пептидные хондропротекторы (полипептидный комплекс, выделенный из хрящевой и костной ткани молодых телят, ППКХ и пептид AED) показали свою эффективность в моделях ОА у животных и в клинических исследованиях [1, 2]. Цель работы – оценить влияние ППКХ и пептида AED на синтез провоспалительных цитокинов IL-1 α и TNF- α в хондроцитах, полученных от молодых и старых крыс.

Материалы и методы исследования. Первичную культуру хондроцитов получали из межпозвоночных дисков молодых (3 мес.) и старых (20 мес.) беспородных белых крыс. Клетки на 4 пассаже разделяли на 5 групп: 1 – контроль, 2, 3 – добавление пептида AED в концентрациях 200 нг/мл и 2000 нг/мл, 4, 5 – добавление ППКХ в концентрациях 200 нг/мл и 2000 нг/мл. Для анализа синтеза цитокинов в хондроцитах было проведено иммуноцитохимическое исследование. В работе использовали первичные моноклональные антитела к IL-1 α (1:50), TNF α (1:200) (Thermo Fisher Scientific, США). Ядра клеток докрашивали Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific, США).

Зеленая и красная флуоресценция характеризовала экспрессию исследуемых маркеров (инкубация со вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 647 (1:2000). Исследование проводили на конфокальном микроскопе LSM 710 (Zeiss GmbH, Германия). Изображения анализировали в программе ImageJ (National Institutes of Health, США) по 5 полям зрения при $\times 200$. Площадь экспрессии рассчитывали, как отношение площади иммунопозитивных клеток к общей площади клеток в поле зрения, и выражали в %. Статистическая обработка данных включала подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала. Для попарного сравнения групп применяли t-критерий Стьюдента ($p < 0,01$).

Результаты исследования. Экспрессия провоспалительного цитокина TNF α была выше в 2,1 раза в культурах хондроцитов, полученных от старых животных по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов молодых животных (таблица). Только при добавлении ППКХ в концентрации 2000 нг/мл в культуру хондроцитов старых животных происходило достоверное снижение площади экспрессии TNF α в 1,9 раза по сравнению с контролем. При старении хондроцитов также наблюдалось увеличение синтеза IL-1 α в 3,8 раза (таблица). Снижение экспрессии IL-1 α в 1,6 и 1,9 раза в культурах хондроцитов старых животных наблюдалось при добавлении ППКХ в концентрациях 200 и 2000 нг/мл. Пептиды AED и ППКХ не влияли на синтез провоспалительных цитокинов в хондроцитах, полученных от молодых животных (таблица).

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА СИНТЕЗ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ХОНДРОЦИТАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ ЖИВОТНЫХ

	Площадь экспрессии, %			
	TNF α		IL-1 α	
	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных
Контроль	0,37 \pm 0,06	0,78 \pm 0,08#	0,44 \pm 0,07	1,66 \pm 0,12#
Пептид AED, 200 нг/мл	0,39 \pm 0,08	0,65 \pm 0,11	0,40 \pm 0,06	1,34 \pm 0,18
ППКХ, 200 нг/мл	0,32 \pm 0,09	0,69 \pm 0,12	0,36 \pm 0,06	1,01 \pm 0,10*
Пептид AED, 2000 нг/мл	0,34 \pm 0,06	0,73 \pm 0,07	0,44 \pm 0,08	1,40 \pm 0,17
ППКХ, 2000 нг/мл	0,38 \pm 0,07	0,41 \pm 0,06*	0,35 \pm 0,06	0,87 \pm 0,10*

– $p < 0,01$ по сравнению с контролем в культурах хондроцитов молодых животных,

* – $p < 0,01$ по сравнению с контролем в культурах хондроцитов старых животных

Заключение. Установлено, что при старении в хондроцитах активируется синтез провоспалительных цитокинов IL-1 α и TNF- α . Это может являться одним из факторов, инициирующих развитие ОА. ППКХ статистически значимо снижает синтез IL-1 α и TNF- α в хондроцитах при их старении. Таким образом, хондропротекторное действие ППКХ при ОА в эксперименте и клинике может быть обусловлено его противовоспалительным действием, выражающемся в уменьшении синтеза цитокинов IL-1 α и TNF- α .

Литература.

1. Повознюк В.В., и др. Изучение влияния пептидных регуляторов на структурно-функциональное состояние костной ткани крыс при старении. Успехи геронтологии.

2007. 20(2): 134-137.

2. Рыжак Г.А., и др. Перспективы применения пептидного биорегулятора для профилактики и лечения возраст-ассоциированных заболеваний опорно-двигательного аппарата (обзор экспериментальных данных). Патогенез. 2019. 17(3): 13-24.

3. Ding X., et al. Cadherin-11 involves in synovitis and increases the migratory and invasive capacity of fibroblast-like synoviocytes of osteoarthritis. International Immunopharmacology. 2015. 26(1): 153–161.

4. Laberge R., et al. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. Nature Cell Biology. 2015. 17(8)

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО / КОЛИЧЕСТВЕННОГО ПРИБОРНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРА СЕПСИСА ПРОКАЛЬЦИТОНИНА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА «АМПЛИТЕСТ® SEPSIS-ИХА»

Шипулин Г.А., Тарасова Ж.Е., Костенко С.Н., Свиридова М.А.

Центр постгеномных технологий ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Прокальцитонин- белок, вырабатываемый клетками щитовидной железы, маркер бактериальных инфекций и сепсиса, его концентрация в крови коррелирует с тяжестью инфекционного процесса. При системном воспалении количество данного вещества в крови резко увеличивается в течение 6-12 ч. Определение уровня прокальцитонина позволяет диагностировать сепсис, оценить тяжесть бактериального поражения и гнойно-воспалительных реакций в организме, а также определить эффективность антибиотикотерапии. Уровень прокальцитонина может служить показателем этиологии инфекции и руководством для принятия решения о назначении антибактериальных препаратов.

В 2019 году Всемирная организация здравоохранения опубликовала документ, признающий прокальцитонин единственным маркером, рекомендованным в качестве вспомогательного теста для решения вопроса о необходимости назначения антибактериальной терапии.

Период полувыведения прокальцитонина составляет 25-35 часов, что позволяет быстро отследить снижение его концентрации при улучшении состояния пациента. Именно поэтому тест на прокальцитонин может быть использован для мониторинга течения заболевания и эффективности проводимой антибактериальной терапии.

Концентрация прокальцитонина в сыворотке/плазме крови здоровых людей менее 0,1 нг/мл. Уровень от 0,1 нг/

мл до 0,5 нг/мл — локальный инфекционный процесс. 0,5 нг/мл — 2 нг/мл свидетельствуют о том, что возможна системная бактериальная инфекция. Уровень прокальцитонина выше 2 нг/мл до 10 нг/мл — системная воспалительная реакция, сепсис. Значения выше 10 нг/мл указывают на развитие тяжелого сепсиса и/или септического шока. В данном случае очень важно следить за концентрацией прокальцитонина с целью мониторинга динамики течения воспалительного процесса.

Цель работы: создание и апробация высокочувствительного набора реагентов для быстрого полуколичественного / количественного приборного определения маркера сепсиса прокальцитонина в сыворотке и плазме крови методом иммунохроматографического анализа (ИХА).

В основе разработанного набора реагентов лежит принцип тонкослойной хроматографии и специфической связи антигена с антителом в комплексе с цветным маркером. Интенсивность окрашивания аналитических зон прямо пропорциональна концентрации прокальцитонина в образце. Регистрация сигнала производится визуально или с помощью видеодигитального диагностического анализатора.

В ходе исследования в качестве окрашенного маркера для тест-системы выбраны латексные наночастицы диаметром 300 нм. Разработаны и оптимизированы условия синтеза конъюгатов латексных частиц с моноклональными антителами, специфическими к прокальцитонину. Подобран состав мультимембранного композита, условия

и буферный состав для эффективной сорбции реагентов тест-системы. Экспериментально проверена чувствительность, специфичность, воспроизводимость и стабильность работы набора реагентов. Проведена калибровка видеодигитального анализатора для компьютерной визуализации, анализа и документирования результатов определения концентрации маркера сепсиса — прокальцитонина.

С помощью тест-кассеты набора проводится определение прокальцитонина в сыворотке и плазме крови методом ИХА двумя способами:

- полуколичественный — с использованием карты пациента со сравнительной шкалой;
- количественный приборный — с использованием видеодигитального анализатора. Прибор позволяет в течение 1 минуты измерить коэффициенты отражения аналитической и контрольной зон теста, и в зависимости от интенсивности окрашивания, определить концентрацию прокальцитонина в пробе.

В результате исследований разработан и апробирован высокочувствительный набор реагентов для быстрого полуколичественного / количественного приборного определения маркера сепсиса прокальцитонина в сыворотке и плазме крови методом ИХА. Аналитическая чувствительность набора 0,1 нг/мл, время анализа 15 минут. Первый отечественный приборный (количественный) иммунохроматографический тест на прокальцитонин имеет большой потенциал для практического использования в сфере лабораторной диагностики.

АКТИВНОСТЬ β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ В ЭФФЕКТОРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Матвеева К.С., Шевырев Д.В.

АНО ВО "Научно-технологический университет "Сириус" (НТУ "Сириус"), Сириус, Сочи, Россия

Введение. По данным ВОЗ, к 2050 году ожидается удвоение численности населения старше 60 лет. Старение популяции ложится тяжелым социально-экономическим бременем, поскольку с возрастом происходит значительное повышение риска развития и тяжелого течения различных аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний [1,2].

Все возрастные хронические заболевания ассоциируются с конвергенцией ключевых атрибутов старения, которые лежат в основе возрастной дисфункции тканей, связанной с накоплением сенесцентных клеток. Накопление стареющих и сенесцентных клеток с возрастом приводит к негативным изменениям в функционировании организма и его старению в целом [3]. В 1995 году было высказано предположение, что стареющие клетки характеризуются повышенной экспрессией β -галактозидазы (β -Gal), которая проявляет активность в смещенном оптимуме pH=6,0. Такая ассоциированная с сенесцентностью β -Gal получила название SA- β -Gal [4], и на сегодняшний день является наиболее универсальным и широко используемым маркером сенесцентных клеток.

Регуляторные Т-клетки (Treg) играют ключевую роль в поддержании периферической аутоотолерантности и уча-

ствуют в ограничении избыточного иммунного ответа [5–7]. В основе нарушения равновесия между эффекторным и регуляторным звеньями иммунитета может лежать старение Treg и их переход в сенесцентное состояние. Несмотря на интенсивные исследования в области иммуностарения, свойства сенесцентных Treg-клеток изучены недостаточно. Поэтому представляется актуальным исследовать особенности старения и механизмы перехода Treg-клеток в сенесцентное состояние.

Цель работы. Цель работы заключается в изучении различных популяций регуляторных и эффекторных Т-лимфоцитов человека в контексте оценки их сенесцентного статуса по активности β -Gal в зависимости от возраста.

Материалы и методы. Объектами данного исследования являлись популяции CD3⁺CD4⁺CD25^{high}CD127^{dim}/neg (CD4⁺Treg) и CD3⁺CD8⁺CD127⁺HLA-DR⁺ (CD8⁺ Treg) Т-лимфоцитов, выделенные из фракции мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови условно-здоровых доноров двух возрастных групп (23–32 года и 50–61 года). Предметом исследования являлось изучение активности β -Gal в различных популяциях эффекторных и Treg-клеток периферической крови человека.

Активность β -Gal оценивали в популяциях $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD4^+Treg^-$ и $CD8^+Treg^-$ -лимфоцитов. Дополнительно активность β -Gal оценивали в субпопуляциях Т-лимфоцитов, положительных и негативных по маркерам активации CD25 и HLA-DR.

Оценку активности β -Gal фракции МНК проводили при помощи коммерческого набора CellEvent™ Senescence Green Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) согласно протоколу производителя методом проточной цитометрии. Предварительно клетки окрашивали миксом антител против поверхностных маркеров. Статистическая обработка полученных данных производилась с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7.03.

Результаты. При анализе МНК человека популяция $CD4^+Treg^-$ -лимфоцитов в сравнении с $CD4^+$ -лимфоцитами демонстрирует сниженную активность β -Gal. Среди субпопуляций $CD8^+$ -лимфоцитов популяция $CD3^+CD8^+CD127^+HLA-DR^+$ обладает более высокой активностью β -Gal в сравнении с $CD8^+$ -лимфоцитами, что характеризует их как популяцию активированных клеток. Однако, для популяции $CD8^+Treg^-$ в сравнении с $CD8^+$ -лимфоцитами значимых отличий в активности β -Gal обнаружено не было. Между популяциями $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов по активности β -Gal также не было выявлено существенных различий.

В Т-лимфоцитах, положительных по маркерам активации CD25 и HLA-DR, активность β -Gal была выше в сравнении с Т-лимфоцитами, негативными по данным маркерам. При сравнении исследуемых субпопуляций между донорами двух возрастных групп статистически значимые различия не были обнаружены. Однако процентное содержание $CD8^+HLA-DR^+$ - и $CD4^+HLA-DR^+$ -лимфоцитов положительно коррелировало с возрастом доноров.

Заключение. Таким образом, повышенная активность β -Gal в субпопуляциях $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов человека, несущих маркеры активации CD25 и HLA-DR, может

быть отражением отличий в метаболической активности между этими популяциями. Сниженная активность β -Gal в популяции $CD4^+Treg^-$ -лимфоцитов в сравнении с общей популяцией $CD4^+$ -лимфоцитов также может косвенно отражать особенности энергетического метаболизма конвенциональных $CD4^+Treg^-$ -клеток. Повышение процентного содержания $CD4^+HLA-DR^+$ - и $CD8^+HLA-DR^+$ -лимфоцитов в периферической крови человека, коррелирующее с увеличением возраста доноров, указывает на накопление antigen-experienced Т-лимфоцитов с возрастом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №23-15-00443.

Список литературы

1. Kennedy B.K. et al. Geroscience: linking aging to chronic disease // Cell. 2014. Vol. 159, № 4. P. 709–713.
2. Cai Y. et al. The landscape of aging // Sci China Life Sci. 2022. Vol. 65, № 12. P. 2354–2454.
3. Garcia H.G. et al. Chapter Two — Thermodynamics of Biological Processes // Methods in Enzymology / ed. Johnson M.L., Holt J.M., Ackers G.K. Academic Press, 2011. Vol. 492. P. 27–59.
4. Dimri G.P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo // Proc Natl Acad Sci U S A. 1995. Vol. 92, № 20. P. 9363–9367.
5. Sakaguchi S. et al. Regulatory T Cells and Human Disease // Annu Rev Immunol. 2020. Vol. 38. P. 541–566.
6. Akkaya B., Shevach E.M. Regulatory T cells: Master thieves of the immune system // Cell Immunol. 2020. Vol. 355. P. 104160.
7. Rocamora-Reverte L. et al. The Complex Role of Regulatory T Cells in Immunity and Aging // Frontiers in Immunology. 2021. Vol. 11.
8. Rivera A. et al. Nonhuman Primate Models of Immunosenescence // Handbook of Immunosenescence / ed. Fulop T. et al. Cham: Springer International Publishing, 2019. P. 125–152.

ПОПУЛЯЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ САРМАТОВ И МЕОТОВ НИЖНЕГО ПОДОНЬЯ: ПАЛЕОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АУТОСОМНЫХ STR-ЛОКУСОВ

Арамова О.Ю.^{1,2}, Вдовченков Е.В.¹, Флоринская В.С.¹, Тищенко А.А.¹, Корниенко И.В.^{1,2}

¹ Южный федеральный университет (ЮФУ), Ростов-на-Дону, Россия

² Южный научный центр Российской академии наук (ЮНЦ РАН), Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Территория юга России имеет множество археологических памятников и останков древних народов. Сарматы — кочевые разрозненные племена, в III в. н. э. обитавшие между Каспием и Доном, расселились в степях Северного Причерноморья вплоть до Днепра. Меоты — древний оседлый народ, живший преимущественно на нижней и средней Кубани, вдоль юго-восточного побережья Азовского моря, известного как «Меотийские болота», а также на Нижнем Дону [1]. В настоящее время неизвестен язык меотов, а также их происхождение. Помимо этого, всё еще отдельно стоит вопрос о сарматизации меотов — характере и степени влияния на них сарматов.

Актуальность исследования заключается в установлении происхождения изучаемых обществ, определения их генетических и популяционных характеристик, дополнении малочисленных палеогенетических данных о народах, населявших современную территорию юга России.

Целью настоящей работы стало определение популяционных характеристик сарматов и меотов I–III вв. н. э., обнаруженных на территории Нижнего Подонья, согласно распределению частот аллелей аутосомных STR-локусов.

Материалы и методы. Объектами исследования стали костные останки из погребений меотской культуры Темерницкого и Нижнегниловского городища (современная

территория г. Ростова-на-Дону) и курганного могильника среднесарматской культуры «Черкасов» (Аксайский район Ростовской области). Оба памятника относятся к погребениями I–III вв. н. э.

Работа с археологическим материалом проводилась в стерильной зоне, согласно правилам работы с древней ДНК. Объекты исследования прошли этап деконтаминационной обработки для исключения возможного загрязнения биоматериала. [2,3]. Экстракцию ДНК проводили фенол-органическим методом в 3 независимых параллелях.

Типирование STR-локусов проводили по системам CoDIS «Эксперт 26» (Гордис) и Identifiler Plus (Applied Biosystems). Фрагментный анализ образцов проводили с помощью ДНК-анализатора ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) согласно руководству пользователя. Обработку результатов электрофореза и идентификацию аллелей проводили с помощью программы GeneMapper ID (версия 3.2). Для каждого из препаратов ДНК типирование проводили в 5 повторностях.

Оценка популяционных характеристик была произведена с использованием базы данных «pop.STR» [4]. В расчет брали локусы, где частота успешного типирования аллелей в исследуемой выборке ≥ 8 . Общий коэффициент LR по всем исследуемым локусам (при независимости частот аллелей) оценивался произведением локальных коэффициентов по всем локусам:

$$LR = LR_1 \times LR_2 \times \dots \times LR_n$$

Если $LR > 1$, то это свидетельствует в пользу первой гипотезы, в противном случае — в пользу второй гипотезы [5].

Основные результаты. Оценка коэффициентов правдоподобия гипотез о принадлежности сарматов к той или иной метапопуляции по всем исследованным локусам $LR = P(\text{«Central South Asia»})/P(\text{«Africa»}) = 2.909$ свидетельствует в пользу предположения о принадлежности STR-генотипа к популяционной выборке «Central South Asia». Расчет LR с учетом мажорных аллелей $LR = P(\text{«East Asia»})/P(\text{«Africa»}) = 75,9$ свидетельствует в пользу предположения о принадлежности наиболее часто встречающихся аллелей сарматов к популяционной выборке «East Asia».

Оценка коэффициентов правдоподобия гипотез о принадлежности меотов к той или иной метапопуляции по всем исследованным локусам $LR = P(\text{«Central South Asia»})/P(\text{«Africa»}) = 3.524$, $LR = P(\text{«Europe»})/P(\text{«Africa»}) = 3.591$ свидетельствует в пользу предположения о принадлежности STR-генотипа к популяционной выборке «Central South Asia» и «Europe». Расчет LR с учетом мажорных аллелей $LR = P(\text{«Europe»})/P(\text{«East Asia»}) = 4,27$ свидетельствует в пользу предположения о принадлежности наиболее часто встречающихся аллелей сарматов к популяционной выборке «Europe», нежели к «East Asia».

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют об азиатском происхождении исследованных сарматов и европейском происхождении меотов Нижнего Подонья I–III вв. н. э. и дополняют малочисленные сведения о данных народах, населявших территорию юга России.

Работа выполнена гранта РФФИ № 22–28–02000 «Комплексное историко-культурное и молекулярно-генетическое исследование древнего населения Нижнего Подонья в сарматское время».

Список использованной литературы:

1. Вдовченков Е.В. Нижнедонская контактная зона взаимодействия номадов и оседлого населения в первые века н. э. // Материалы по археологии и истории античного и средневекового Причерноморья. — 2017. — № 9. — С. 355–366.
2. Арамова О.Ю., Фалеева Т.Г., Махоткин М.А., Андриянов А.И., Корниенко И.В. Инновационная методика деконтаминации археологического биологического материала // Генетика-фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции. — 2019. — С. 89–90.
3. Пат. 2789387 Российская Федерация, МПК А61L 2/18, А61L 101/26, А61L 101/28, А61L 101/22, А61L 101/32. Композиция для удаления ДНК и/или РНК-содержащего биологического материала (варианты) / Корниенко И. В., Фалеева Т. Г., Арамова О. Ю. ; патентообладатель Корниенко И. В., Фалеева Т. Г. — № 2021129837; заявл. 11.10.2021; опублик. 02.02.2023.
4. База данных «pop.STR» <http://spsmart.cesga.es/popstr.php> (дата обращения: 28.08.2023).
5. Buckleton J. S., Bright J. A., Taylor D. (ed.). Forensic DNA evidence interpretation. — CRC press, 2018.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЖИДКОСТНОЙ И ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИЙ ИЗ МОЧИ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП АНТИДЕПРЕССАНТОВ: ФЛУОКСЕТИН, АМИТРИПТИЛИН, МИРТАЗАПИН

Куликова В.К.¹, Новикова Л.С.¹, Киричек А.В.^{1,2}, Шабалина А.Э.²

¹ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

² ФГКУ «111ГЦ СМиКЭ» МО РФ, Москва, Россия

Актуальность. В настоящее время депрессия является одним из наиболее распространенных заболеваний, которым страдают около 4,4% мирового населения. Депрессивное расстройство также является причиной ухудшения здоровья людей [1]. При лечении данного типа заболевания

применяются различные группы препаратов, в том числе селективные ингибиторы обратного захвата моноаминов или трициклические антидепрессанты. За последние несколько десятилетий были разработаны антидепрессанты, названные атипичными, так как их механизм действия от-

личен от других препаратов данной группы лекарственных средств [2]. В настоящей работе для исследования используются антидепрессанты следующих групп: трициклические (амитриптилин), ингибиторы серотонина (флуоксетин), ингибиторы норадреналина (миртазапин). Таким образом, качественное определение и количественное обнаружение этих веществ необходимо как для клинической, так и для судебной токсикологии. В качестве биоматериала может использоваться моча, кровь, плазма [3].

Цель. Цель данной работы изучение и сравнение возможностей методов жидкость-жидкостной и твердофазных экстракций антидепрессантов из мочи для создания корректной и действующей методики экспертного исследования с наилучшим результатом.

Методы. Для подготовки биоматериала к последующему извлечению в мочу были добавлены анализируемые вещества в виде приготовленных растворов из соответствующих порошкообразных субстанций в концентрации 0,1 мг/мл в пересчете на чистое вещество-основание.

Для жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) использовали 5 мл биоматериала, подкисляли серной кислотой до значений pH 3, очистку проводили 15 мл эфира (первичная экстракция), вытяжку сливали. Затем извлечение доводили до pH 9 раствором аммиака, экстракция проводилась хло-

роформом в три этапа: 5 мл, 3 мл, 3 мл. Хлороформную вытяжку фильтровали через безводный сульфат натрия. После полного испарения пробы смывались 1000 мкл хлороформа для дальнейшего исследования методом ГХ/МС.

Для твердофазной экстракции (ТФЭ) использовались колонки Thermo Scientific C8 3 мл 200 мг/3 мл, Accu Bond C18 200 мг/3 мл, SampliQ Evidex 200 мг/3 мл. Анализ проводился с помощью вакуумной камеры от Agilent Technologies. Для активации колонки первым этапом пропускали метанол, затем фосфатный буфер с pH 6,5. После в колонку помещали пробу мочи объемом 3 мл, колонку промывали водой до полного высушивания. Экстракция проводилась в два этапа: 3 мл раствор ацетон:дихлорметан 1:1, затем 3 мл дихлорметан:изопропанол:25% раствор аммиака 78:14:8. После полного испарения пробы смывались 1000 мкл хлороформа и исследовались методом ГХ/МС.

При извлечении каждым методом пробы экстрагировали трижды. Ниже представлена сводная таблица 1, в которой приведены средние площади пиков детектируемых веществ, способы экстракции и соотношение площади пика вещества, полученного методом ТФЭ к ЖЖЭ без пересчета на объем. Исследуемые вещества имеют времена удерживания: 6,40 мин (флуоксетин), 7,47 мин (амитриптилин), 7,70 мин (миртазапин).

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ ПЛОЩАДЕЙ ПИКОВ ВЕЩЕСТВ, ПОЛУЧЕННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ ЭКСТРАКЦИИ.

Название вещества	$S_{\text{средняя пика}}$	Способ экстракции	Отношение $S_{\text{ср. т. фз}} / S_{\text{ср. жжэ}}$
флуоксетин	88309118,67	жидкость-жидкостная	1
	364120394	Accu Bond	4,12:1
	354867918,3	SampliQ	4,02:1
	247472096,7	Thermo Scientific	3,8:1
амитриптилин	233867640,3	жидкость-жидкостная	1
	552353890,7	Accu Bond	6,25:1
	558610649	SampliQ	6,33:1
	549915902	Thermo Scientific	6,23:1
миртазапин	319032399,3	жидкость-жидкостная	1
	672938942,3	Accu Bond	7,62:1
	751428288,3	SampliQ	8,51:1
	681710766,7	Thermo Scientific	7,72:1

Выводы. По результатам проведенного исследования можно судить о высокой эффективности использования твердофазной экстракции в сравнении с методом жидкость-жидкостной экстракции. Важно отметить, что для ЖЖЭ использовалось большее количество биоматериала (5мл). Общие результаты выхода веществ, полученных методом ТФЭ, больше ЖЖЭ в 4-8 раз для данных веществ.

Между колонками для ТФЭ можно отметить некоторые различия в выходе веществ, но единая тенденция не прослеживается, что с большей вероятностью связано с индивидуальными особенностями веществ и сорбента в колонке.

Список литературы:

1. W.H. Organization, Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates, in, World Health Organization, World Health Organization, 2017.
2. T.M. Hillhouse, J.H. Porter, A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate, Exp. Clin. Psychopharmacol. 23 (2015) 1–21.
3. Y. Feng, M. Zheng, X. Zhang, K. Kang, W. Kang, K. Lian, J. Yang, Analysis of four antidepressants in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry combined with sensitive and selective derivatization, J. Chromatogr. A 1600 (2019) 33–40.

ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПАРОДОНТОПАТОГЕНОВ С ЦЕЛЬЮ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЛОСТИ РТА. МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД

Аронова Е.Б.¹, Дмитриенко М.А.², Мороз А.С.¹, Иванова А.²

¹ ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО «СПбПУ»), Санкт-Петербург, Россия

² ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» (ООО «АМА»), Санкт-Петербург, Россия

Введение. Подавляющее большинство заболеваний пародонта носит воспалительный характер [1]. Ранняя/своевременная диагностика воспалительных заболеваний пародонта позволяет избежать патологических состояний, развитие которых постепенно вовлекает все ткани пародонта, что приводит к разрушению зубочелюстной системы человека. Воспаление десен возникает под влиянием бактерий и продуктов их жизнедеятельности, совокупность которых обуславливает патогенную микрофлору, формирует микробную биопленку на поверхности зуба и в пришеечной части десны [2, 3].

Наивысшим патогенным потенциалом и агрессивным воздействием на ткани пародонта обладают бактерии «красного комплекса», включающего *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*. Общий признак патогенной микрофлоры, ассоциированной с заболеваниями пародонта, представлен высокой активностью протеолитических ферментов [3]. Данную ферментативную активность можно рассматривать как вирулентность патологического и хронического воспаления, которое приводит к повреждению тканей пародонта [4, 5].

Таким образом, протеолитическая активность ротовой полости может являться индикатором (или подтверждением) развития воспалительного процесса в тканях пародонта и использоваться для выявления пародонтопатогенной микрофлоры ротовой полости.

Цель исследования — совершенствование методики оценки протеолитической активности микробиоты ротовой полости на этапах планирования, диагностики и лечения стоматологических заболеваний.

Основные задачи, которые решались в процессе работы, заключались в экспресс-оценке протеолитической активности ротовой полости, валидации методики методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, в также апробация усовершенствованной методики в клинических и лабораторных условиях.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 48 испытуемых в возрасте от 18 до 65 лет, нуждающиеся в лечебно-профилактических мероприятиях, с целью контроля и предотвращения развития воспалительных заболеваний пародонта. Все обследованные пациенты дали информированное согласие на проведение процедуры.

Экспресс-оценка протеолитической активности ротовой полости проводилась с помощью устройства, принцип действия которого основан на том, что трипсиноподобный фермент, вырабатываемый бактериями «красного комплекса», являясь фактором их вирулентности, расщепляет пигментобразующий субстрат с последующим образованием хромофора. Гидролиз сопровождается цветовой

реакцией, которая свидетельствует о наличии протеолитической активности в пробе из ротовой полости.

Для проведения исследования брали биоматериал из зубодесневой борозды и соскоб с корня языка. Пробы наносили на субстратный слой устройства, рядом друг с другом. После нанесения, субстратный слой совмещался с гидрофильным индикаторным слоем, содержащим азокраситель. Интерпретация результатов выполнялась через 10 минут после термостатирования устройства в диапазоне 38–45 °С.

Результат оценивался как положительный при формировании пятен — изменение цвета индикаторного элемента устройства с лососевого на светло-голубой или синий. Интенсивность цветового пятна оценивали при помощи колориметрической шкалы, верифицированной в ходе лабораторного исследования устройства, на концентрациях раствора трипсина в диапазоне от 0.0167 мг/мл до 5 мг/мл. При отсутствии изменения цвета, результат расценивался как отрицательный. В качестве референсного метода проводили количественный ПЦР-анализ. ДНК выделяли из образцов с использованием коммерческого набора для выделения ДНК и РНК «Преп-НК-Био». Для выявления и количественной оценки ДНК возбудителей заболеваний пародонта методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени в биологическом материале использовался набор реагентов «Дентоскрин» (производитель НПФ «Литех», Россия, комплектация OneStep-PB-60).

Основные результаты. Выявлено, что устройство имеет значимую корреляцию с количественным результатом ПЦР-анализа трех бактерий «красного комплекса» (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*). Для биоматериала из зубодесневой борозды ($r = 0.680$, $p < 0.001$) она выше, чем для соскоба с корня языка ($r = 0.428$, $p < 0.001$). Анаэробные свойства бактерий «красного комплекса», которые в большей степени представлены в безвоздушной среде зубодесневой борозды и ассоциированы с воспалительными заболеваниями пародонта, свидетельствуют в пользу полученного результата и подтверждают целесообразность взятия биоматериала преимущественно из зубодесневой борозды.

Показано, что самая высокая корреляция выявлена между результатами устройства и содержанием *T. denticola* в зубодесневой борозде ($r = 0.862$, $p < 0.001$), а также в соскобе с корня языка ($r = 0.899$, $p < 0.001$). Данный результат свидетельствует, что биоматериал, обладающий протеолитической активностью, в основном был представлен бактериями «красного комплекса».

Для испытуемых, принимающих участие в исследовании, взятие биоматериала из зубодесневой борозды не

было болезненным или травмирующим, в сравнении со взятием соскоба с корня языка, но являлось более информативным при оценке протеолитической активности.

Таким образом, в качестве методического указания, можно рекомендовать для ПЦР-анализа и оценки протеолитической активности брать образец из зубодесневой борозды.

Заключение. В результате исследования впервые была создана методика, которая определяет порядок действий при оценке протеолитической активности микробиоты ротовой полости на этапах планирования, диагностики и лечения стоматологических заболеваний. Методика экспресс-диагностики протеолитической активности в ротовой полости показала статистически значимую корреляцию с результатами ПЦР-анализа. На основании сказанного можно сделать вывод, что данная методика экспресс-диагностики при соблюдении всех методических рекомендаций для определения протеолитической активности в ротовой полости может быть альтернативой ПЦР-анализу. Экспресс-диагностика не требует дорогостоящего оборудования, специальной подготовки медицинского персонала и

может быть рекомендована для повседневного использования в клинической практике.

Исследование выполнено в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» (Договор 075-15-2021-1333 от 30.09.2021).

1. Иванов В.С. Заболевания пародонта, М.: Медицина, 1989, 277.

2. Schenkein, H.A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology* 2000 2006, 40, 77–93.

3. Könönen, E.; Gursoy, M.; Gursoy, U. Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 1135–1165

4. Travis, J.; Potempa, J. The Biphasic Virulence Activities of Gingipains: Activation and Inactivation of Host Proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2003, 4, 443–450.

5. Guo, Y.; Nguyen, K.-A.; Potempa, J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: From cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontology* 2000 2010, 54, 15–44.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИСТОРИЯ ДРЕВНЕГО НАСЕЛЕНИЯ УРОЧИЩА ЭКИ-ОТТУГ (ЦЕНТРАЛЬНАЯ ТЫВА) В ПЕРИОД НАЧАЛО X ВЕКА ДО Н.Э. – КОНЕЦ X ВЕКА Н.Э.

Альборова И.Э., Мустафин Х.Х.

Московский физико-технический институт (МФТИ), г. Долгопрудный, Московская область, Россия

Долина среднего течения р. Эрбек Центральной Тывы является замкнутой системой, где, с одной стороны, с древнейших времён непрерывно проживало коренное население, а с другой, в силу выгодности географического положения и благоприятных климатических условий было возможно проникновение групп людей, носителей иных культур, проживавших на соседних территориях. Исследованные в долине р. Эрбек диахронные археологические памятники, относящиеся к эпохе поздней бронзы, к скифскому периоду, к эпохе хунну и времени тюрков, демонстрирует, с одной стороны, самостоятельное развитие населения, а с другой, — заимствования ряда культурных традиций, сопровождающихся, в частности, определённым изменением генофонда. Состоянию генофонда населения долины р. Эрбек в период начало X века до н.э. – конец X века н.э. посвящено настоящее исследование.

Для исследования были получены образцы зубов от 64 индивидов из коллекции Института истории материальной культуры РАН и Музея антропологии и этнографии имени Петра Великого РАН «Кунсткамера». Пробоподготовка и выделение ДНК осуществлялось в специализированной лаборатории посредством перчаточных боксов с системой замены атмосферного воздуха на азот особой чистоты. Для всех индивидов ДНК была выделена с использованием известного протокола, широко применяемого лабораторией для древних образцов. Качество и количество выделенной ДНК, а так же пол индивидов, оценивались с помощью на-

бора реагентов Qantifiler Trio. Для мужских индивидов был проведен фрагментный анализ Y-хромосомы, получены гаплотипы и предсказаны гаплогруппы. С использованием таргетного NGS были подтверждены и уточнены гаплогруппы Y-хромосомы, получены также полные последовательности митохондриальной ДНК и фенотипические SNP мутации. По гаплогруппам Y-хромосомы наблюдается преобладание генетической преемственности, которая проявляется в наличии определённого ряда гаплогрупп у мужских индивидов из разных эпох. В то же время наблюдаются генетические результаты миграции населения со стороны иных регионов. В частности, обнаружен факт прямой генетической связи восточных скифов с географически удалёнными западными скифами. Исследования однородительских маркеров ДНК позволили выявить в ряде погребений, относящихся к одной эпохе, генетических родственников по мужской и женской линиям.

В перспективе планируется масштабное исследование полученной коллекции ДНК с использованием полногеномного NGS.

Исследование проведено по гранту Российского Научного Фонда № 22-28-01505 «Реконструкция генетической структуры доисторических популяций Центральной Азии и Южной Сибири на примере локальных групп древнего населения долины р.Эрбек (Российская Федерация, Республика Тыва) по данным археологии, антропологии и палеогенетики».

X-СЦЕПЛЕННЫЕ CNV И АСИММЕТРИЧНАЯ ИНАКТИВАЦИЯ X-ХРОСОМОСЫ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Фонова Е.А., Толмачева Е.Н., Кашеварова А.А., Лопаткина М.Е., Никитина Т.В., Лебедев И.Н.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия,

Введение. Инактивация X-хромосомы (XCI — X chromosome inactivation) — процесс, посредством которого одна из двух X-хромосом женского организма подвергается транскрипционному молчанию, происходит в раннем эмбриогенезе. Чаще всего инактивация одной из двух X-хромосом происходит случайным образом в среднем соотношении 50/50%. Асимметричная инактивация X-хромосомы (sXCI) от 80 и более процентов в общей популяции встречается до 4%, однако, при X-сцепленных заболеваниях отмечается повышение частоты sXCI до 50%. В случаях, когда фенотипически здоровая женщина является одновременно носительницей X-сцепленного патогенного варианта, а также имеет sXCI, то риск проявления заболевания существует для её потомков, унаследовавших мутацию. Проявление патогенного X-варианта у потомков мужского пола или женского пола с равновероятной инактивацией может привести к эмбриолетальности или к различным отклонениям в дальнейшем развитии. Возможно, что вариации числа копий участков ДНК (Copy Number Variation, CNV) могут быть одним из факторов, влияющим на характер инактивации X-хромосомы, особенно в тех случаях, когда в них задействованы гены, контролирующие процессы деления и клеточной пролиферации на ранних этапах преимплантационного развития организма.

Цель и задачи. Целью исследования являлось установление модифицирующей роли инактивации X-хромосомы в проявлении микроделений и микродупликаций хромосом при невынашивании беременности и нарушении эмбрионального развития человека.

Для достижения цели были решены следующие задачи:

1. Определение частоты асимметричной инактивации X-хромосомы у женщин с невынашиванием беременности и спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX.

2. Выявление несбалансированных микроструктурных хромосомных перестроек на X-хромосоме у женщин и абортусов с нормальным кариотипом с асимметричной инактивацией X-хромосомы.

Материалы и методы. Были сформированы выбор-

ки из 313 женщин с невынашиванием беременности и 135 женщин без проблем с репродукцией, а также из 152 спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX и 88 индуцированных абортусов с кариотипом 46,XX. Для анализа статуса инактивации X-хромосомы использован метод, основанный на амплификации высокополиморфного экзона 1 гена рецептора андрогена (AR, Xq12) с использованием метил-чувствительной количественной ПЦР. Продукты ПЦР разделяли с помощью фрагментного анализа. Степень инактивации одной из родительских X-хромосом $\geq 90\%$ принималась как асимметричная инактивация (sXCI). У женщин и абортусов с sXCI проведён поиск микроструктурных вариаций копийности ДНК с помощью сравнительной матричной геномной гибридизации с использованием чипа SurePrint G3 Human CGH Microarray 8x60K (Agilent Technologies, США). Обнаруженные несбалансированные хромосомные варианты подтверждены с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Основные результаты. В группе женщин с невынашиванием беременности частота асимметричной XCI была статистически значимо выше (6,7%), чем у женщин без проблем с репродукцией (2,2%, $p=0,019$). Частота смещения инактивации X-хромосомы в группе женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) была выше (7,6%), чем у женщин с единственной потерей беременности в анамнезе (5,1%), однако, эти различия не были статистически значимы. Частота асимметричной инактивации в группе спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX составила 7,4%, тогда как в группе контроля не было выявлено ни одного случая асимметричной инактивации ($p=0,04$). Проведен поиск X-сцепленных CNV с помощью метода матричной сравнительной геномной гибридизации для всех случаев sXCI. Для 7 спонтанных абортусов с sXCI не было выявлено ни одной X-сцепленной CNV. У 6 женщин с невынашиванием беременности и 2 женщин из контрольной группы были обнаружены CNV как на аутосомах, так и на X-хромосоме (таблица 1). Выявленные CNV на X-хромосоме представляли собой микродупликации в регионах Xq28 и микроделеции в регионах Xp11.23 и Xq24.

ТАБЛИЦА 1. СПЕКТР CNV У ЖЕНЩИН С SXCI

Код семьи	XCI в лимфоцитах (%)	aCGH, (ISCN 2020)	Размер	Кариотип абортуса	XCI (%) в экстраэмбриональной мезодерме	Происхождение CNV у абортуса
PLG1	96	arr[GRCh37] Xp11.23 (47881447_47932977)x1	52 kb	46,XX	72	mat
PLG2	100	arr[GRCh37] Xq24 (118555586_118794279)x1	239 kb	46,XX	70	mat
				46,XY	0	mat
				46,XY	0	mat

PLG3	90	arr[GRCh37] Xq28(154976660_155232214)×3	255,6 kb	–	–	–
PLG4	95	arr[GRCh37] Xq28 (154976684_155232907)×3	256 kb	46,XX	73	нет
PLG5	97	arr[GRCh37] Xq28 (153666039_153666485)×3	447 bp	46,XY	0	mat
PLG6	95	arr[GRCh37] Xq28 (154450164_155232907)×3	782,7 kb	46,XX	гомозигота по AR	mat
CG1	94	arr[GRCh37] Xq24 (117509030_117545557)×1	36,53 kb	–	–	–
CG2	90	arr[GRCh37] Xq28 (153666039_153666485)×3	447 bp	–	–	–

Примечание: PLG — pregnancy loss group (группа с невынашиванием беременности); CG — control group (контрольная группа)

Заключение. Асимметричная инактивация может являться маркером несбалансированных микроструктурных хромосомных вариантов на X-хромосоме, ассоциированных с ранней остановкой эмбрионального развития. Тестирование характера инактивации X-хромосомы может быть важ-

ным дополнительным элементом диагностики наследственных причин идиопатического невынашивания беременности.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-65-00017, <https://rscf.ru/project/21-65-00017/>

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА И АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТАРНЫХ ФЕРМЕНТОВ КАК МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ С РАССТРОЙСТВАМИ ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА В ПОЗДНЕМ ВОЗРАСТЕ

Черемных Е.Г., Позднякова А.Н., Прохорова Т.А., Савушкина О.К., Терешкина Е.Б., Бокша И.С., Шешенин В.С.

ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Актуальность. Актуальность изучения психических расстройств в позднем возрасте обусловлена процессом старения населения, увеличением общего числа пациентов старшего возраста, в том числе с поздно манифестирующими расстройствами шизофренического спектра. Обширные исследования в области шизофрении позволили обнаружить разнообразные биологические механизмы, участвующие в развитии этого заболевания.

В контексте современных представлений о природе заболеваний шизофренического спектра не вызывает сомнения вклад в их патогенез хронического нейровоспаления. Воспаление сопровождается повышением концентрации провоспалительных компонентов и изменением окислительного/антиоксидантного статуса до развития окислительного стресса, который, в свою очередь, стимулирует активность системы комплемента. При этом у пожилых пациентов — в соответствии с возрастными изменениями в энергетическом метаболизме — происходит существенное утяжеление психической симптоматики.

Цель настоящего исследования — поиск клинко-биологических корреляций в группе больных с поздно манифестирующими расстройствами шизофренического спектра для выделения среди биологических параметров маркеров, ценных для предикции эффективности антипсихотической

терапии. Задачи исследования решались путем определения в плазме крови функциональной активности системы комплемента (СК), как одного из компонентов иммунной системы и определения активности цитохром с-оксидазы (ЦО), характеризующей энергетический метаболизм, активности ферментов глутаматного метаболизма (ГДГ), ферментов антиоксидантного статуса — глутатионредуктазы (ГР) и глутатион-S-трансферазы (ГСТ). Активность ферментов энергетического и глутаматного метаболизма, а также антиоксидантного статуса определяется в тромбоцитах.

Материал и методы. В исследование были включены 18 пациентов (13 женщин и 5 мужчин) в возрасте 52-89 лет (медиана 68 [57; 80]) с поздно манифестирующими психозами шизофренического спектра (после 40 лет) (F20, F25, F22.8). Оценка состояния больных с использованием шкалы позитивных и негативных синдромов (PANSS) и взятие крови для определения активности ферментов проводились перед началом курса фармакотерапии (базовые клинические и биологические параметры) и на 28-й день терапии.

Критериями исключения являлись: наличие иных психических и неврологических заболеваний, деменций различной этиологии, травм головного мозга, тяжелых соматических заболеваний в стадии декомпенсации.

Плазму и тромбоциты выделяли из образцов веноз-

ной крови, взятой в вакутейнеры с 3,2% цитратом натрия.

Функциональную активность системы комплемента (фаСК) оценивали с помощью разработанного нами метода с использованием в качестве тест-организмов инфузорий *Tetrahymena pyriformis*. Анализ основан на связи активации системы комплемента с гибелью инфузорий при воздействии плазмы крови и реализуется путем циклического подсчета количества живых клеток инфузорий в растворе сыворотки/плазмы крови на разработанном нами приборе БиоЛат с программой AutoCiliata (Россия).

Активности ферментов ГДГ, ГР, ГСТ, ЦО определяли спектрофотометрическими кинетическими методами с использованием планшетного спектрофотометра xMark (Bio-Rad).

Статистический анализ базы данных проводили с использованием модуля “непараметрический анализ” программы Statistica 8.0 (StatSoft). Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Значимые положительные корреляции обнаружены между биологическими показателями у больных шизофренией до лечения — выявлена прямая связь между фаСК и активностью ЦО и ГДГ ($R=0,56, p=0,015$), фаСК и ГР ($R=0,47, p=0,047$). После лечения эти связи исчезли.

Значимое изменение исследуемых параметров в ходе лечения обнаружено только для активности фаСК ($p=0,0004$, парный тест Вилкоксона). Для остальных параметров достоверных изменений в ходе лечения не выявлено.

Обнаружены положительные корреляции между биохимическими показателями и балльной оценкой по субшкалам PANSS. Так, наблюдалась связь между активностью ЦО и суммой баллов по подшкале негативных симптомов PANSS-Neg после лечения ($R = 0,49, p < 0,04$).

Заключение. Результаты данного пилотного исследова-

ния показали перспективность исследования фаСК и определения активности ферментов глутаматного, энергетического метаболизма и глутатионового обмена у больных с поздно манифестирующими расстройствами шизофренического спектра в периферической крови. Обнаруженные положительные корреляционные связи между фаСК и активностью ферментов энергетического, глутаматного и глутатионового метаболизма свидетельствуют о том, что активация фаСК у больных связана с повышением активности изученных ферментов, но механизмы этого явления сложны и требуют дальнейшего изучения, в том числе не только при психозах шизофренического спектра в пожилом возрасте, но и при других психических заболеваниях с вовлечением активации СК.

Проведенные исследования показали наличие значимой корреляции между базовой активностью ЦО и баллами по PANSS-Neg, т.е. параметром, отражающим эффективность фармакотерапии. В данном исследовании удалось обнаружить единственную значимую клинико-биологическую связь, что, вероятно, объясняется малочисленностью обследованной группы больных и требует дополнительных исследований на более многочисленной группе.

Совершенствование дифференциальной диагностики расстройств шизофренического спектра в позднем возрасте с вовлечением биологических параметров создает основы для разработки эффективных методов профилактики и лечения эндогенных психозов. Разработка новых подходов к анализу данных об изменении как иммунологических параметров, так и изменения активности ферментов энергетического и глутаматного метаболизма, антиоксидантных ферментов при расстройствах шизофренического спектра вносит вклад в понимание особенностей этиологии и патогенеза расстройств

ПАЛЕОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ УЧАСТКОВ D-ПЕТЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК *MAMMUTHUS PRIMIGENIUS*

Тищенко А.А.¹, Арамова О.Ю.^{1,2}, Флоринская В.С.¹, Корниенко И.В.^{1,2}, Титов В.В.^{1,2}

¹ Южный федеральный университет (ЮФУ), Ростов-на-Дону, Россия

² Южный научный центр Российской академии наук (ЮНЦ РАН), Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Шерстистый мамонт (*Mammuthus primigenius*) является представителем семейства Хоботных, обитавшим на территории Евразийского континента в период позднего плейстоцена. К настоящему времени митохондриальные геномы ряда шерстистых мамонтов уже расшифрованы [1-3]. Однако, несмотря на это, важность проблемы исследования функционально-значимых участков D-петли митохондриальной ДНК (мтДНК) остается на высоком уровне поскольку позволяет прояснить эволюционные связи представителей данного вида внутри семейства.

Актуальность исследования заключается в обогащении генетической информации о представителях вида *M. primigenius*, населявших территорию Евразии, а также в предоставлении углубленного анализа генетической изменчивости популяции этих животных, обитавших на се-

веро-востоке континента в период позднего плейстоцена.

В связи с этим целью настоящего исследования стало изучение функционально-значимых участков D-петли митохондриальной ДНК представителей вида *M. primigenius*.

Материалы и методы. Объектами исследования послужили костные остатки четырех представителей вида *M. primigenius*, обнаруженных в северо-восточном районе Сибири в Республике Якутия. Предполагаемый возраст остатков мамонтов составляет 32 000 лет.

Пробоподготовка объектов перед экстракцией ДНК включала этапы деконтаминации и декальцинации с учетом особенностей древнего материала [4]. Выделение ДНК проводили методом фенол-органической экстракции. Постановку ПЦР «в реальном времени» осуществляли с использованием набора реактивов «EVA Green» и коротких

специфичных праймеров на участки D-петли мтДНК. Исследование проводили в 5 проворностях. Специфичность полученных продуктов амплификации детектировали посредством проведения электрофореза в 2% агарозном геле.

Для очистки ДНК, предшествующей секвенированию, использовали магнитные частицы «CleanMag». Секвенирование образцов проводили на генетическом анализаторе 3130xl Applied Biosystem и реагентов BigDye Terminator v3.1, Thermo FS. В завершении, полученные данные подвергались биоинформационному анализу с использованием базы данных «NCBI», а также программного обеспечения «Sequencing analysis» (версия 5.4).

Основные результаты. В процессе исследования была проведена успешная амплификация ДНК двух представителей *M. primigenius*. Для остатков двух других представителей вида была отмечена высокая степень деградации матрицы ДНК, что не позволило провести дальнейшие исследования.

Анализ полученных данных с применением биоинформационных методов привел к выводу, что участок 14816-16789 н.п. обнаруженных остатков двух якутских мамонтов свидетельствует о принадлежности их к виду *M. primigenius*. Длина последовательностей D-петли мтДНК варьировала от 80 до 100 нуклеотидов. Выявлены полиморфизмы функционально-значимых участков D-петли в отношении ранее изученного генома Малоляховского мамонта [5], а именно: C15614T, G15640, G15696, T15739C.

Заключение. Полученные результаты важны для понимания внутривидовой генетической изменчивости и способствуют углубленному пониманию эволюционных взаимосвязей внутри линии *M. primigenius*, найденных на территории России.

Исследование выполнено в рамках реализации госзадания ЮНЦ РАН, № гр. проекта 01201363186.

Список использованной литературы:

1. Krause J., Dear P.H., Pollack J.L., Slatkin M., Spriggs H., Barnes I., Lister A.M., Ebersberger I., Pääbo S., Hofreiter M. Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae // Nature. — 2006. — Т. 439. — №. 7077. — С. 724-727.
2. Poinar H.N., Schwarz C., Qi J., Shapiro B., Macphee R.D., Buigues B., Tikhonov A., Huson D.H., Tomsho L.P., Auch A., Rampp M., Miller W., Schuster S.C. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA // Science. — 2006. — Т. 311. — №. 5759. — С. 392-394.
3. Корниенко И.В., Фалеева Т.Г., Орешкова Н.В., Григорьев С.Е., Григорьева Л.В., Путинцева Ю.А., Крутовский К.В. Структурно-функциональная организация контрольного района митохондриальной ДНК шерстистого мамонта (*Mammuthus primigenius*) // Молекулярная биология. — 2019. — Т. 53. — № 4. — С. 627-637.
4. Арамова О.Ю., Фалеева Т.Г., Махоткин М.А., Андриянов А.И., Корниенко И.В. Инновационная методика деконтаминации археологического биологического материала // Генетика-фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции. — 2019. — С. 89-90.
5. Kornienko I.V., Faleeva T.G., Oreshkova N.V., Grigoriev S.E., Grigoreva L.V., Simonov E.P., Kolesnikova A.I., Putintseva Yu.A., Krutovsky K.V. Complete mitochondrial genome of a woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*) from MalyLyakhovsky Island (New Siberian Islands, Russia) and its phylogenetic assessment // Mitochondrial DNA Part B. — 2018. — V. 3. — № 2. — P. 596-598.

КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ, ОВЕРЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ РЕЦЕПТОРЫ TFR1 И DC-SIGN, ОБЛАДАЮТ ПОВЫШЕННОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТЬЮ К ВИРУСАМ

Савенкова Д.А.^{1,2}, Алхиреенко Д.А.¹, Прудникова Е.Ю.¹, Зайковская А.В.¹, Головки Ю.А.¹, Иматдинов И.Р.¹, Пьянков О.В.¹, Юдкин Д.В.¹

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), Кольцово, Россия

² Новосибирский государственный университет (НГУ), Новосибирск, Россия

Введение. Культуры клеток эукариот стали неотъемлемой частью современной биологии. Они применяются во многих исследованиях, в том числе посвященных изучению особенностей вирусов, их жизненного цикла и патогенеза. Так, с применением клеточных линий ведется разработка противовирусных препаратов и вакцин. Также существует ряд методов детекции вирусных инфекций, основанных на клеточных технологиях. Однако, естественной восприимчивости нативных клеточных линий бывает недостаточно для заражения. Таким образом, создание культур клеток, демонстрирующих повышенную восприимчивость к исследуемым вирусам, является актуальной задачей молекулярной биологии и вирусологии для создания эффективного диагностического инструмента. Одним из способов создания таких линий клеток является увеличение количества рецепторов, необходимых вирусу для связывания с клеткой-мишенью и проникновения его внутрь.

В данной работе рассматривается получение трансгенных клеточных линий на основе Vero, обладающих повышенным уровнем экспрессии рецепторов hTfR1 и DC-SIGN и исследование их восприимчивости к вирусным инфекциям.

Целью данной работы было создание трансгенных клеточных линий на основе Vero, экспрессирующих рецептор hTfR1 или DC-SIGN, и исследование восприимчивости полученных культур к вирусам. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. На основе линии Vero создать несколько трансгенных клеточных культур, в геноме которых имеется встройка трансгена, содержащая ORF *TFRC* (*TfR1*) или *CD209* (*DC-SIGN*) человека и гена пуromицин-N-ацетил-трансферазы под управлением CMV-промотора.

2. Для каждой линии оценить число интеграций трансгена в геном, а также место локализации этих встроек

на хромосомах. Исследовать экспрессию трансгена на уровне мРНК и белка.

3. Исследовать восприимчивость трансгенных линий к вирусам путем проведения заражения естественным вирусом или с использованием псевдотипированного лентивируса.

Материалы и методы. Клеточные линии, обладающие повышенной экспрессией рецепторов hTfR1 и DC-SIGN, были получены путем интеграции генетических конструкций, содержащих ORF *hTfR1* или *DC-SIGN*, в геном клеток линии Vero системой транспозона Sleeping Beauty по ранее описанному методу [Дольский и др., 2022]. Для каждой исследуемой линии был оценен уровень экспрессии трансгена. Исследования восприимчивости клеток к вирусам в случае линий, экспрессирующих рецептор DC-SIGN (Vero-DC-SIGN), осуществляли с использованием вируса Крым-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ). Для линий, обладающих повышенной экспрессией рецептора hTfR1 (Vero-TFRC), для оценки их восприимчивости применяли лентивирус третьего поколения, псевдотипированный белком GPC аренавируса и несущий ген зеленого флуоресцентного белка. Оценка эффективности трансдукции лентивирусом проводилась методом проточной цитометрии.

Результаты. Мы показали, что трансгенные клеточные линии, демонстрирующие высокий уровень экспрес-

сии рецепторов hTfR1 и DC-SIGN, обладают повышенной восприимчивостью к вирусам по сравнению с исходной линией Vero. Для линии Vero-DC-SIGN показано увеличение вирусной нагрузки относительно линии Vero. По результатам проточной цитометрии линия Vero-TFRC демонстрирует более чем в два раза большее число флуоресцирующих клеток, чем Vero, что указывает на повышенную восприимчивость трансгенной линии к псевдотипированному лентивирусу.

Выводы. Трансгенез с использованием системы транспозона Sleeping Beauty может эффективно использоваться для создания линий с оверэкспрессией определенных рецепторов для вирусологических работ. Повышенная экспрессия рецепторов hTfR1 и DC-SIGN достаточна для увеличения восприимчивости клеточных линий к некоторым вирусам.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

Список литературы.

1. Дольский А.А., Грищенко И.В., Боднев С.А. и др. Экспрессия белка LAMP1 человека повышает продукцию вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 в трансгенных клеточных линиях на основе Vero // Молекулярная биология. 2022. Т. 56(3). С. 503-509.

ФЕНОТИПЫ СТАРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА КАК КЛЮЧ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОМУ ПОДХОДУ В ГЕРИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Мамчур А.А.¹, Шарашкина Н.В.², Ерёма В.В.¹, Каштанова Д.А.¹, Иванов М.В.¹, Бруттан М.В.¹, Зеленова Е.А.¹, Шелли Е.М.², Остапенко В.С.², Джуманиязова И.Х.¹, Маткава Л.Р.¹, Юдин В.С.¹, Акопян А.А.², Стражеско И.Д.², Майтесян Л.В.², Тарасова И.В.², Белошевская О.А.², Кескинов А.А.¹, Краевой С.А.¹, Ткачева О.Н.², Юдин С.М.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России); 119121, Россия, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 1.

² Обособленное структурное подразделение «Российский геронтологический научно-клинический центр» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ОСП РГНКЦ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России); 129226, Россия, г. Москва, 1-я улица Леонова, д. 16.

Актуальность. Современная медицина позволяет человеку дожить до 90 лет, несмотря на наличие хронических заболеваний. Поэтому среди долгожителей можно встретить как очень сохранных людей, так и очень хрупких. Диагностические и терапевтические методики, хорошо подходящие одному пациенту, могут оказаться менее эффективными для другого. Таким образом, существует необходимость в стратификации пациентов, чтобы приблизиться к персонализированному подходу в гериатрической практике.

Цель. Перед исследователями стояла цель разработать подход к стратификации пациентов в возрасте 90 лет и старше. Для этого выполнены следующие задачи: охарактеризована гетерогенность набранной выборки долгожителей; выделены фенотипы старения человека; разработан и провалидирован калькулятор, позволяющий отнести любого пожилого пациента к определённой фенотипической группе.

Методы. В данном исследовании мы проанализировали 2688 долгожителей в возрасте 90 лет и старше, которым была проведена комплексная гериатрическая оценка с обязательным определением следующих показателей: данные о наличии или отсутствии сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), сахарного диабета (СД), хронической обструктивной болезни лёгких (ХОБЛ), онкологических заболеваний в настоящее время, полипрагмазии, а также следующие показатели: индекс массы тела, значение динамометрии справа, баллы MMSE, FAB, SPPB, Bartel, IADL, GDS-5.

К выборке из 2592 долгожителей была применена кластеризация с помощью алгоритма Agglomerative Clustering библиотеки scikit-learn (Python 3.9.12). Полученные 5 кластеров сравнивались по представленности заболеваний, биохимическим показателям крови и мочи, результатам гериатрических шкал и выживаемости в течение года.

В качестве калькулятора фенотипов старения представлен мультиклассовый классификатор, созданный с помощью метода опорных векторов на базе библиотеки scikit-learn. Для создания модели исходная кластеризованная выборка разделена на обучающую (80% участников) и тестовую (20% участников). Внешняя валидация проводилась на участниках, ранее не входивших в выборку для кластеризации — их фенотип был определён врачами-гериатрами. Для анализа качества модели использовались следующие метрики: accuracy, precision, recall, F-метрика. Также были построены ROC-кривые по принципу «один-против-остальных».

Результаты. По результатам кластеризации были выделены 5 групп долгожителей. Кластеры 0 и 4 характеризуются наличием всех заболеваний, но не у 100% участников. Кластер 1 оказался единственным, в который не вошли участники со старческой астенией. Деменция присутствовала во всех кластерах, но в сочетании с разными заболеваниями. В кластере 3 деменция обнаруживается у 100% участников при отсутствии практически всех других заболеваний. Кластер 2 отличался наличием сахарного диабета у 100% участников. Для представителей кластера 1 характерны более высокие значения общего билирубина, кластера 2 — более высокий уровень триглицеридов и гликированного гемоглобина. Кластер 3 отмечен более высоким уровнем гомоцистеина. Для кластера 4 характерны более низкий уровень креатинина и альбумина, но более высокий уровень ферритина. Также для участников из кластеров 3 и 4 характерен более низкий уровень витамина D, а кластеры 2 и 4 — низкий уровень ЛПВП-холестерина. На основа-

нии полученных результатов нам удалось проаннотировать полученные кластеры, соотнеся их с фенотипами старения: 0 — мультиморбидный, 1 — сохранный, 2 — метаболический, 3 — дементный, 4 — низкофункциональный.

Данные о выживаемости в течение года были известны для 926 участников. Полученные для каждого кластера кривые выживаемости были аппроксимированы экспонентами и продлены до 6000 дней. Рассчитанные медианные выживаемости распределились по фенотипам следующим образом: сохранный — 2300 дней, метаболический — 1249 дней, мультиморбидный — 926 дней, дементный — 694 дня, низкофункциональный — 597 дней.

Мультиклассовый классификатор, позволяющий отнести каждого долгожителя к определённой фенотипической группе, после обучения на 80% кластеризованной выборки при тестировании показал среднюю площадь под ROC-кривой 0,9992. При внешней валидации на 96 долгожителях, фенотип которых был определён врачом, средняя площадь под кривой составила 0,92.

Заключение. Используя методы кластеризации, мы определили пять фенотипов старения (один сохранный и четыре астеничных), тем самым стратифицируя пациентов для последующего наблюдения врачами. Разработанная модель машинного обучения позволяет определить фенотип каждого конкретного долгожителя со средней точностью 92%. Использование модели в реальной клинической практике совместно с предложенным прогнозом выживаемости и клиническими рекомендациями для каждой группы упростит принятие гериатрических решений.

ВОЗРАСТНЫЕ ЗАВИСИМОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У КОРЕННЫХ И ПРИШЛЫХ ЖИТЕЛЕЙ АРКТИЧЕСКОЙ ЗОНЫ ЯКУТИИ

Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Коганова З.И., Загайнова А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России), Москва, Россия

Актуальность. Окислительный стресс является неспецифической реакцией организма в ответ на воздействие различных повреждающих факторов. С возрастом активность антиоксидантных ферментов с той или иной скоростью падает, а содержание в крови маркеров перекисного окисления имеет тенденцию к возрастанию. Исходя из этого, в геронтологии часто используется термин «ускоренное старение», которым обозначают более выраженные возрастные изменения показателей окислительного стресса в изучаемой выборке по сравнению с контрольной или ранее изученными. Как правило, признаки ускоренного старения наблюдаются в популяциях, на которые давит дополнительный повреждающий фактор — экологический, генетический или любой иной природы [Kitani K., 2007; Gil L., 2011; Sanchez-Rodríguez M.A. et al., 2005; Muchova J. et al., 2001]

Для жителей арктических регионов таким фактором является экстремальный климат с необычайно низкими температурами, геомагнитными возмущениями, нарушением

фотопериодичности и т.п. Окислительный стресс еще в 70-е годы прошлого века был выделен как одно из центральных звеньев «синдрома полярного напряжения» — комплекса нейроэндокринных, метаболических и иммунных реакций, характерных для жителей Заполярья [Казначеев В.П. с соавт., 1980; Бойко Е.Р., 2005]. Известно также, что коренные и пришлые жители Арктики существенно различаются по способности адаптироваться к низким температурам, что связывают с направленным действием эволюционного отбора в процессах адаптации Homo sapiens к климатическим условиям северных стран, которая началась 30-40 тыс. лет назад и сопровождалась постепенным повышением частот «выгодных» и снижением частот «невыгодных» аллелей для тех генов, которые имеют отношение к процессам теплообмена [Cardona A. et al., 2014; Степанов В.А. с соавт., 2017; Hallmark B. et al., 2019].

Цель исследования. Сравнительный анализ возрастных изменений показателей окислительного стресса в про-

бах крови коренных и пришлых жителей арктической зоны Якутии.

Методы. Представленные данные были получены при проведении многопараметрического обследования населения арктической зоны Якутии в рамках выполнения Госзадания ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Организация обследования соответствовала установленным требованиям, включая заполнение бланка информированного согласия обследуемых жителей на участие в исследовании. Пробы венозной крови были отобраны у 137 мужчин из поселков Чокурдах и Тикси в возрасте от 17 до 78 лет (Me 37; Q1 27; Q3 49). Кровь отбирали в вакутейнеры с гепарином лития и транспортировали в Москву в замороженном виде.

В лизатах цельной крови определяли активность супероксиддисмутазы (SOD) по ингибированию реакции аутоокисления адреналина, каталазы (CAT) по ингибированию образования окрашенного комплекса перекиси водорода с молибденово-кислым аммонием, глутатионпероксидазы (GPx) по скорости восстановления гидроперекиси трет-бутила восстановленным глутатионом и содержание малонового диальдегида (MDA) по образованию окрашенного комплекса с тиобарбитуровой кислотой. Математический анализ полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Statistica (StatSoft) v. 7.0

Основные результаты. Доля пришлых жителей составляла в п. Чокурдах 32,1% (26 чел. из 81), в п. Тикси 19,6% (11 чел. из 56) и в объединенной выборке обследованных лиц 27 % (37 чел. из 137). Тем не менее подвыборки коренных ($n=100$) и пришлых ($n=37$) жителей имели сходные логнормальные распределения возрастных характеристик и не различались достоверно по возрасту (коренные жители 37 [29; 50] лет, пришлые 34 [26; 47] лет; $p=0,407$ в двустороннем тесте Манна-Уитни).

В полной выборке обследованных жителей активность SOD и CAT с возрастом медленно снижалась ($R=-0,254$; $p=0,003$ и $R=-0,196$; $p=0,022$ соответственно), активность GPx не менялась ($R=0,042$; $p=0,630$), а содержание MDA проявляло слабую тенденцию к возрастанию, немного не дотянувшую до принятой в биологии границы достоверности ($R=0,160$; $p=0,061$).

В подвыборках коренных и пришлых жителей наблюдались сходные возрастные тренды активностей SOD и CAT

— медленное снижение с возрастом. Но для двух других показателей разделение обследованных жителей на коренных и пришлых изменяло возрастные зависимости качественно. Активность GPx у пришлых жителей быстро падала с возрастом ($R=-0,549$; $p=0,001$) параллельно с нарастанием содержания MDA ($R=0,420$; $p=0,01$), тогда как у коренных жителей возрастные изменения GPx и MDA отсутствовали.

Полученные нами данные по снижению активности GPx и увеличению содержания MDA в пробах крови по мере увеличения возраста пришлых жителей Якутии свидетельствуют об ускоренном старении этой категории населения по сравнению с генетически более приспособленными коренными обитателями арктической зоны.

Анализ литературных данных показывает, что проживание в неблагоприятных климатических условиях не проходит бесследно и для коренных жителей, поскольку среди жителей умеренных климатических зон практически не встречается случаев достоверного снижения активности CAT с возрастом — этот показатель чаще всего не меняется [Andersen H.R. et al., 1997; Bolzan A.D. et al., 1997; Bogdanska J.J. et al., 2003; Junqueira V.B. et al., 2004] и иногда даже растет [Inal M.E. et al., 2001; Cecerska-Heryc E. et al., 2022], предположительно адаптивно.

Выводы. Изучение механизмов адаптации организма человека к экстремальным климатическим условиям имеет большое научно-практическое значение для разработки профилактических мероприятий, направленных на сохранение здоровья местного населения и тем самым на выполнение государственной стратегии развития Арктической зоны Российской Федерации.

Выявленные различия в возрастных изменениях GPx и MDA у коренных и пришлых жителей Арктики предположительно ведут к различиям в генетическом полиморфизме транскрипционных факторов *GPx1*, но не самого гена *GPx1*.

Альтернативное объяснение исходит из интегрального характера системы окислительного равновесия организма и заключается в предположении о том, что полученные нами данные отражают суммарный проигрыш пришлого населения Якутии коренному по всем генетическим локусам, отобранным эволюцией как более выгодные для проживания в экстремальных условиях Арктики.

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОСТРУКТУРНОГО ВОЛНОВОДА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ НА МИКРОБНЫЕ КЛЕТКИ

Коннова С.С.^{1,2}, Лепилин П.А.^{1,2}, Скибина Ю.С.¹

¹ ООО НПП «Наноструктурная технология стекла», Саратов Россия

² Институт физики Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия.

Актуальность. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам — важная задача для диагностики и назначения препаратов для лечения тех или иных бактериальных инфекций. При этом сроки определения эффективного препарата играют важную роль для сохранения жизни и здоровья пациента. Горизонтальный перенос генов

антибиотикорезистентности позволяет микроорганизмам приобретать в короткие сроки новые свойства, связанные с устойчивостью к препаратам, что усложняет работу диагностических лабораторий, заставляя каждый раз проводить длительное исследование по выявлению эффективных антибиотиков для лечения. Чувствительными к антибиотику

считаются те микроорганизмы, на которые антибиотик оказывает бактерицидное или бактериостатическое действие, то есть уничтожает их или останавливает их рост и развитие. Классические методы бактериологии позволяют выявить эффективные антибиотики в течение суток и более, но наша задача сократить эти сроки и большие возможности для этого предоставляют сенсорные системы на основе микроструктурных волноводов с поллой сердцевинной.

Цель. Целью данной работы было исследование возможностей микроструктурного волновода для регистрации чувствительности бактериальных клеток к антибиотикам.

В качестве исследуемого объекта был выбран штамм *K-12 E. coli (Escherichia coli)* наиболее изученный и простой в культивировании.

Методы. На первом этапе работы исследовали спектры живых и убитых термолизисом клеток (инкубация при 65°C в течение 10 минут). Ночную культуру отмывали и ресуспендировали в физиологическом растворе до 104 и 108. Суспензией клеток объемом 40 мкл заполняли капилляр диаметром 250 мкм с помощью капиллярных сил. Излучение галогенной лампы Avalight-HAL-S-MINI2, ("Avantes", Нидерланды) в видимом диапазоне пропускали через капилляр и регистрировали спектр пропускания среды с помощью спектр-анализатора AvaSpec-ULS4096CL-EVO ("Avantes", Нидерланды).

На втором этапе исследовали воздействие β — лактамного антибиотика ампициллина, в конечных концентрациях 25, 75 и 150 мкг/мл. Предварительные исследования дисковым методом показали чувствительность штамма *E. coli* к данному антибиотику. Готовили суспензию

клеток в концентрациях 104 и 108. После добавления антибиотика, суспензию клеток инкубировали 30 минут при 30°C. Как и на первом этапе работы регистрировали спектры пропускания и обрабатывали полученные данные в программе Origin 2021.

Благодаря микроструктуре волновода, представляющего собой 5 концентрических микрокапиллярных слоя, уложенных вокруг поллой сердцевинной — удается добиться усиления выходного излучения и более высокой чувствительности волновода к происходящим изменениям в анализируемой среде.

Выводы. Исследование показало значительные различия в спектрах пропускания убитых термолизисом и живых бактериальных клеток. Значения интенсивности для живых клеток в 2 раза превышали показатели для убитых температурой клеток, одновременно диапазон интенсивностей спектров пропускания для живых клеток значительно превышал таковой для убитых. Спектры убитых бактерий характеризовались меньшей выраженностью, большей сглаженностью пиков.

Изучение чувствительности модельного микроорганизма *E. Coli K12* к антибиотику пенициллин показало, что бактерицидный эффект достигался уже при конечной концентрации антибиотика 25 мг/мкл, а значения интенсивности спектров пропускания снижаются с увеличением концентрации антибиотика и времени инкубации микроорганизма с пенициллином.

Таким образом, микроструктурный волновод с поллой сердцевинной является перспективным для создания биологического сенсора для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В И С В ОТДЕЛЕНИЯХ ХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ СТАЦИОНАРОВ НИЖЕГОРОДСКОГО РЕГИОНА

Полянина А.В., Новоселова А.А., Кашникова А.Д., Зайцева Н.Н.

ФБУН «ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Актуальность. Возбудители вирусных гепатитов В (ГВ) и С (ГС) с парентеральным механизмом передачи, протекающие чаще всего бессимптомно и приводящие к развитию цирроза и гепатоцеллюлярного рака, являются актуальной проблемой всемирного здравоохранения. Значительная распространенность ГВ и ГС указывает на необходимость анализа обращаемости пациентов, в том числе инфицированных вирусами гепатитов В (ВГВ) и/или С (ВГС), в соматические отделения стационаров для оценки эпидемиологической ситуации и возможного предотвращения внутрибольничного инфицирования.

Целью исследования: оценка распространенности маркеров ВГВ и ВГС среди пациентов отделений хирургического профиля соматических стационаров Нижегородского региона в 2018-2022 гг.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы из банка сывороток крови от

пациентов соматических стационаров Нижегородского региона 2018-2022 гг. (n=25076). Лабораторное исследование включало определение суммарных антител к ВГС (анти-ВГС) и HBsAg ВГВ с использованием ИФА-диагностикомов производства АО «Вектор Бест» (Новосибирск). Сыворотки крови, положительные на серологические маркеры возбудителей ГС и ГВ, были исследованы на наличие РНК ВГС и ДНК ВГВ с последующим генотипированием. Для проведения данного анализа использовали метод ПЦР с детекцией в режиме «Real-Time» и коммерческие тест-системы ООО «ИнтерЛабСервис» (г. Москва).

Результаты. В результате скринингового определения серологических маркеров ВГВ и ВГС у пациентов отделений хирургического профиля было выявлено, что превалентность HBsAg ВГВ среди мужчин и женщин в среднем составила 1,5±0,1% и 0,8±0,1% соответственно, антитела к ВГС выявлены у 9,69±0,12% мужчин и 3,73±0,2% женщин.

Среди мужчин HBsAg наиболее часто детектировался в возрастной группе 40-49 лет ($2,9 \pm 0,4\%$), у женщин — в группе старше 60 лет ($1,4 \pm 0,2\%$). Среди детей HBsAg не детектировался.

Частота обнаружения анти-ВГС как среди женщин, так и среди мужчин была наиболее высокой в возрастных группах 30-39 лет и 40-49 лет: у $5,9 \pm 0,5\%$ — $5,7 \pm 0,6\%$ женщин и у $22,4 \pm 1,0\%$ - $20,9 \pm 1,0\%$ мужчин, соответственно. Следует отметить, что в хирургическом отделении детского соматического стационара наибольшее значение показателя превалентности анти-ВГС отмечено среди детей 0-2 лет ($14,5 \pm 4,7\%$), в других возрастных группах данный показатель выявлялся гораздо реже, в среднем в $0,8\%$ случаев (3-4 лет — $1,0 \pm 0,5\%$, 5-9 лет — $0,7 \pm 0,2\%$, 10-14 лет — $0,5 \pm 0,1\%$, 15-17 лет — $0,8 \pm 0,3\%$), что, в свою очередь, свидетельствует о сохранении материнских антител к ВГС в первые годы жизни ребенка и значительной вовлеченности женщин детородного возраста в эпидемический процесс ГС.

При обследовании HBsAg-положительных пациентов на наличие ДНК ВГВ активная инфекция выявлена в $81,2\%$ случаев. Развитие эпидемического процесса ГВ в 2018-2022 гг. среди пациентов региона обусловлено преобладанием D-генотипа ($80,0\%$), A-генотип детектировался в $4,3\%$

случаев. В $15,7\%$ случаев генотип ВГВ не установлен, что, предположительно, обусловлено низкой вирусной нагрузкой, характерной для хронической формы ГВ-инфекции, либо нетипичным для территории генотипом вируса.

РНК ВГС обнаруживалась у $74,3\%$ взрослых пациентов, в крови которых выявлены анти-ВГС. Генотиповое разнообразие ВГС, циркулирующего в Нижегородском регионе, представлено 4 генотипами (1a — $15,1\%$, 1b — $32,1\%$, 2 — $5,7\%$, 3a — $32,1\%$) с преобладанием в равной степени 1b и 3a. Помимо этого, среди РНК ВГС-положительных лиц детектировались смешанные генотипы: 1a/1b — $9,4\%$, 1a/3a — $1,9\%$, 1b/3a — $1,9\%$, 1a/1b — $1,9\%$. Среди анти-ВГС — положительных пациентов детских хирургических стационаров активная инфекция установлена в $21,7\%$ случаев, из них у $70,0\%$ детей детектировался генотип 3a, у $30,0\%$ — 1b.

Выводы. Таким образом, высокие показатели распространенности маркеров парентеральных вирусных гепатитов В и С среди пациентов отделений хирургического профиля указывают на повышенный риск внутрибольничного инфицирования как сотрудников, так и пациентов в случае возникновения аварийных ситуаций, а также при несоблюдении стандартных профилактических и противоэпидемических мероприятий в медицинских организациях.

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел 1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА, СОДЕРЖАЩЕГО СРЕДИННЫЙ ФРАГМЕНТ КАПСИДНОГО БЕЛКА ВИРУСА ГЕПАТИТА Е 1 ГЕНОТИПА

Козлов В.А., Сидоров А.В., Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Зверев В.В. _____ 9

ВЫЯВЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HВV) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Вилисова А.Н. _____ 9

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СРЕДИ УСЛОВНО ЗДОРОВОГО МОЛОДОГО НАСЕЛЕНИЯ СЕВЕРО-ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ ВЬЕТНАМА

Личная Е.В., Bui Thi Thanh Nga, Pham Thi Ha Giang, Петрова О.А., Старкова Д.А., Bui Thi Lan Anh, Tran Thi Nhai, Vo Viet Cuong, Pham Ngoc Quang, Дмитриев В.А., Калинина О.В. _____ 10

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (ВГВ) И СУБТИПИРОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВГВ (HBSAg) С ПОМОЩЬЮ ПАНЕЛИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

Потапова А.А., Маркина Е.В., Порываева В.А., Безуглова Л.В., Нетесова И.Г. _____ 11

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ РНК ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА Е СРЕДИ ДОНОРОВ КРОВИ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

Савчук Т.Н., Гринвальд Е.Н., Абдрахманова С.А., Имашпаев Д.М., Жангазиева К.Х., Саусакова С.Б. _____ 12

КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ HВV DNA (ПЦР-РВ) И КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ HBSAG (ИФА) В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Николаева А.Н., Кан Н.Г., Жолдасова Е.А., Хегай Т.Р. _____ 13

РАЗЛИЧИЯ В ТЕЧЕНИИ У МАКАК ЯВАНСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ 1, 3 И 4 ГЕНОТИПАМИ ВИРУСА ГЕПАТИТА Е

Догадов Д.И., Кюрегян К.К., Миносян А.А., Кочконян А.А., Гончаренко А.М., Карлсен А.А., Шамсутдинова О.А., Черкашина Е.В., Карал-оглы Д.Д., Михайлов М.И. _____ 14

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ДИСПАНСЕРНОЙ ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ ПО ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Муха Т.А., Ситник Т.Н., Кукота И.И., Веретенникова А.А. _____ 15

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ВАРИАНТОВ В ДЕЛЬТА-АНТИГЕНЕ НА ФОЛДИНГ БЕЛКА НУКЛЕОКАПСИДА ВИРУСА ГЕПАТИТА ДЕЛЬТА

Кузьмин О.В., Карлсен А.А., Михайлов М.И., Кюрегян К.К. _____ 16

ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Свирин К.А., Половкова О.Г., Кривошеина Е.И., Федорова Е.С., Камалов М.Н., Карташов М.Ю. _____ 17

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ЛИОФИЛЬНОЙ СУШКИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

Мороз А.С., Идудова М.К., Лисок А.В., Аронова Е.Б., Большаков В.Н. _____ 18

Раздел 2. ВПЧ-ТЕСТИРОВАНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

ВЛИЯНИЕ COVID 19 НА ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО СКРИНИНГА, РАННЮЮ ДИАГНОСТИКУ, ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ И СМЕРТНОСТЬ ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ У ЖЕНЩИН В РЕСПУБЛИКЕ КАРЕЛИЯ

Ковчур П.И., Хидишян И.В. _____ 19

ВЫЯВЛЕНИЕ E7 ГЕНОВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 И 18 ТИПА У ПАЦИЕНТОВ С ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ МЕТОДОМ ПЦР-РВ

Костюк С.А., Пинчук Т.В., Полуян О.С., Можейко Л.Ф., Лямцева А.К. _____ 20

СРАВНЕНИЕ ПЦР-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 И 18 ТИПА Никитина В.А., Вязовая А.А., Холопов Д.В., Топузов Э.Э., Лялина Л.В., Ермаченко Е.Д., Лисок А.В.	21
РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА У ПАЦИЕНТОК С ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМОЙ ШЕЙКИ МАТКИ И ВУЛЬВЫ: ЕСТЬ ЛИ РАЗЛИЧИЯ? Пахарукова М.И., Юшков Б.Г., Кузнецова Е.А.	22
РЕЗУЛЬТАТЫ ПОПУЛЯЦИОННОГО СКРИНИНГА РАКА ШЕЙКИ МАТКИ Логинова О.П., Шевченко Н.И., Воропаева А.В.	24
РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ВПЧ-ТЕСТИРОВАНИЯ У ЖЕНЩИН В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ ЗА ПЕРИОД 2017-2022 гг Гапеев Е. В., Мавричев С.А., Стукалова И. В., Коваленко Д. Г.	25
Раздел 3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ОНКОЛОГИИ	
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ГЕНЕ АТМ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОМ РМЖ Зиннатуллина Г.Ф., Бермишева М.А.	26
ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СПЕКТР ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК КАК МАРКЕР ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ ОПУХОЛЕЙ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ: ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ NST04817501 Кайгородова Е.В., Грищенко М.Ю.	27
ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ЭКЗОСОМАЛЬНЫХ МИКРОРНК У ПАЦИЕНТОВ СО СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМОЙ Иванова Е.А., Асадуллина Д.Д., Гилязова Г.Р., Измайлов А.А., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К., Гилязова И.Р.	28
ДЛИННЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК MEG3, ZEB1-AS СВЯЗАНЫ С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ РАКА ЯИЧНИКОВ Лукина С.С., Бурдённый А.М., Пронина И.В., Филиппова Е.А., Казубская Т.П., Кушлинский Н.Е., Логинов В.И., Брага Э.А.	29
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДИАГНОСТИКИ, ОЦЕНКИ ПРОГНОЗА И ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ Кветной И.М., Зубарева Т.С., Миронова Е.С., Крылова Ю.С., Дохов М.А., Зубарева А.С., Пальцева Е.М.	30
ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ МАРКЕРЫ В ПРОГНОЗЕ РАЗВИТИЯ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИМ ЛАРИНГИТОМ Какурина Г.В., Середа Е.Е., Черемисина О.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Ц.	31
ПОКАЗАТЕЛИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И АКТИВАЦИИ ПОПУЛЯЦИИ Т-КЛЕТОК С РЕГУЛЯТОРНЫМ ФЕНОТИПОМ И МАРКЕРАМИ АПОПТОЗА, ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК PD1, PDL1, TIM3, LAG3 В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТАХ И ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТАХ У ПАЦИЕНТОВ С ПРЕИНВАЗИВНЫМ И МИКРОИНВАЗИВНЫМ РШМ Ковчур П.И., Курмышкина О.В., Ковчур О.И., Волкова Т.О.	32
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НА СИСТЕМНОМ И ЛОКАЛЬНЫХ УРОВНЯХ В ПРОЦЕССЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ, ПРЕИНВАЗИВНОГО И МИКРОИНВАЗИВНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ Ковчур П.И., Курмышкина О.В., Ковчур О.И., Хидишан И.В., Волкова Т.О.	33
МИКРОБИОТА ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ ПОЛОСТИ РТА У МОЛОДЫХ ПАЦИЕНТОВ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР Колегова Е.С., Кононова Л.А., Федорова И.К., Кульбакин Д.Е., Жалсанова И.Ж., Зарубин А.А., Сивцев А.А., Скрябин Н.А., Денисов Е.В.	34
ГЛИОМА: АНАЛИЗ ГЕНОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕННОЙ СЕТИ Майорова А.А., Туркина В.А., Ярема П.О., Волков И.А., Орлов Ю.Л.	35

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ И ПРОГНОЗ ТЕЧЕНИЯ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО Михаленко Е. П., Щаюк А.Н., Шепетько М.Н., Кильчевский А. В.	36
ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ДО И ПОСЛЕ КУРСА РАДИОТЕРАПИИ Михайлова Г.Ф., Цепенко В.В., Мурзаева А.В., Шинкаркина А.П.	38
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ НК-КЛЕТОК ПРИ ГЕНЕРАЦИИ IN VITRO У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ Журиков Р. В., Михайловский Н.В., Рыбачук В.А., Абакушина Е.В.	39
МЫШИНАЯ МОДЕЛЬ НЕЙРОБЛАСТОМЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ GD2 И V7-N3 Луцкович Д.В., Ерофеева А-М.В., Клыч А.В., Маньковская С.В., Мелешко А.Н.	40
ОЦЕНКА ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНА RASSF1 ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО Смирнов С.Ю., Медведь А.В., Кундас Л.А., Субоч Е.И., Портянко А.С.	41
ОЦЕНКА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МАЛЫХ РНК ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА Пушкин А.А., Ряховский С.С., Малек А.В., Курносков И.А.	42
ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР: ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ Горбенко А.С., Столяр М.А., Галанин В.В., Бахтина В.И., Комаровский Ю.Ю., Ольховский И.А.	43
ЗАВИСИМОСТЬ УРОВНЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГРУППЫ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК ОТ ЭТАПА ДИССЕМИНАЦИИ РАКА ЯИЧНИКОВ Пронина И.В., Бурденный А.М., Филиппова Е.А., Лукина С.С., Иванова Н.А., Логинов В.И., Казубская Т.П., Кушлинский Н.Е., Брага Э.А.	44
ГРУППА АБЕРРАНТНО ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ МИКРОРНК В РАЗРАБОТКЕ МИШЕНЕЙ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОГО ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА Пронина И.В., Логинов В.И., Брага Э.А.	45
ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК В ОБРАЗЦАХ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ С РАЗЛИЧНЫМИ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ Смирнов С.Ю., Медведь А.В., Скачкова В.О., Кундас Л.А., Хожовец М.В., Субоч Е.И., Портянко А.С.	46
ВЛИЯНИЕ АБЕРРАНТНОГО СРГ-МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ МИКРОРНК НА АЛЬТЕРАЦИЮ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК ПРИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОМ РАКЕ ЯИЧНИКОВ Пронина И.В., Логинов В.И., Бурденный А.М., Лукина С.С., Филиппова Е.А., Казубская Т.П., Брага Э.А.	47
СРАВНЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МУТАЦИОННЫХ СОБЫТИЙ У ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ Рыболовлева Т.Н., Трегубова Е.В., Сарпова М.В., Назарова Е.Л., Фокина Е.С.	47
ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ А.Н. Тороповский, А.Г. Никитин, О.Н. Павлова	49
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ МРНК ГЕНА MGMT У ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ И ГЛИАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ЕГО ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ Смирнов С.Ю., Пашкевич А.М., Гремза К.С., Кундас Л.А., Субоч Е.И., Портянко А.С.	50
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА FOXR3 В ОПУХОЛЯХ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ О.А. Коровин, Х. Ариуа, А.В. Алясова, Н.В. Красногорова, Д.В. Новико, В.В. Новиков	51
МЕТАБОЛОМНЫЕ И ТРАНСКРИПТОМНЫЕ МАРКЕРЫ СЕРОЗНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКОВ Кутилин Д.С., Гуськова О.Н.	52
ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА TRMT У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ Силин А.Е., Ромашевская И.П., Мартинков В.Н.	53

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE EXPRESSION OF ICAM-1 MOLECULE AND COLORECTAL TUMOR CELLS Mokrane A.	54
АНАЛИЗ МЕТИЛОМА РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНОЙ ГИПЕРПЛАЗИИ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ Пономарева А.А., Щеголева А.А., Гервас П.А., Геращенко Т.С., Панкова О.В., Зарубин А.А., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В., Денисов Е.В.	55
ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ RASSF1 И MGMT КАК МАРКЕР НЕСЕМИНОМНЫХ ГЕРМИНОКЛЕТОЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ Горбач Е.И., Романцова А.С., Кофанов Е.Л., Пахомова И.В.	55
МОДЕЛЬ ОБНАРУЖЕНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛЕВОЙ ДНК В ПЛАЗМЕ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL6 КАК СИНГЕННОЙ МОДЕЛИ МЕЛАНОМЫ B16F10 Коноплина К.М., Мальченкова А.А., Калинина Н.А., Пинюгина М.В., Кособокова Е.Н.	56
РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА В ТОЛСТОЙ КИШКЕ НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ МРНК ГЕНОВ Захаренко М.В., Боженко В.К., Кулинич Т.М., Гончаров С.В., Гончарова О.И., Кудинова Е.А., Солодкий В.А.	57
ТЕОРИЯ ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ ВТОРОГО РОДА ЛАНДАУ В ПРИЛОЖЕНИИ К АНАЛИЗУ ВЛИЯНИЯ ВОЗРАСТА И ПОЛА НА ЧАСТОТУ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ JAK2V617F Суховольский В.Г., Ковалев А.В., Горбенко А.С., Столяр М.А., Ольховский И.А.	59
КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКСПРЕССИИ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК LINC00847 И PROX1-AS1 И МИКРОРНК MIR-647 В ПЛАЗМЕ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЖЕЛУДКА Ветчинкина Е.А., Буре И.В., Калинин А.И., Кузнецова Е.Б., Киселева А.Э., Алексеева Е.А., Немцова М.В.	60
ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ И ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗАМИ Руденкова Т.В., Костюк С.А., Климович Н.Н., Демиденко А.Н., Суворов Д. И.	61
АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА УБИКВИТИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА UBE2Z В ОПУХОЛЕВОЙ И ПЕРИТУМОРАЛЬНОЙ ТКАНЯХ ПАЦИЕНТОВ С ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ОРГАНОВ ГОЛОВЫ И ШЕИ Соболева А.Г., Арутюнян И.В., Ельчанинов А.В., Вишнякова П.А., Полькин В.В., Ратушный М.В., Поляков А.П., Гордон К.Б., Фатхудинов Т.Х.	62
ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА Л.В. Спирина, А.В. Августинович, С.Г. Афанасьев, С.В. Вторушин	63
РАЗРАБОТКА ТАРГЕТНОЙ ПАНЕЛИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК Епифанова А.В., Жиганова М.С., Бабкин А.В., Антонова Е.Н., Кузьмин О.В., Кравцов И.С., Махлай А.А.	64
РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ УРОВНЯ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА VSR-AVL1 МЕТОДОМ ОТ-ПЦР-РВ Куклина Н.Г., Авдоница М.А., Свешникова Е.Д., Шипулин Г.А.	65
ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА В ОТНОШЕНИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ИНВАЗИВНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ Мкртчян Л.С., Киселева В.И., Крикунова Л.И., Бойко Б.В., Замулаева И.А.	66
РЕЗУЛЬТАТЫ РУТИННОГО ТЕСТИРОВАНИЯ МУТАЦИЙ ГЕНОВ HRD: КАКИМИ ДОЛЖНЫ БЫТЬ СЛЕДУЮЩИЕ ШАГИ? Лебедева А.А., Веселовский Е.М., Кавун А.И., Белова Е.В., Григорьева Т.В., Орлов П.С., Субботинская А.И., Шипунов М.В., Машков О.И., Билалов Ф.С., Дюжев Ж., Мигяев О.К., Вытнова Н., Милейко В.А., Иванов М.В.	67

ACMG AUTO CLASSIFIER: ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ КЛАССИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ НА ОСНОВЕ РУКОВОДСТВА ACMG ACMG AUTO CLASSIFIER: SOFTWARE FOR AUTOMATIC CLASSIFICATION OF GENETIC VARIANTS BASED ON THE ACMG GUIDELINES Некрасов А.Ю., Гуськова М.С., Лисица Т.С., Хахина А.О., Черняева Е.Н., Шипулин Г.А.	68
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЦР ПРИ ДЕПАРАФИНИЗАЦИИ СРЕЗОВ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ Кипень В.Н., Буракова А.А., Добыш О.И., Якубовский С.В., Фридман М.В., Кондратович В.А., Лемеш В.А., Кондратенко Г.Г.	69
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ микроРНК ДЛЯ АПРОБАЦИЯ ПРОТОКОЛА ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Кипень В.Н., Буракова А.А., Добыш О.И., Якубовский С.В., Фридман М.В., Кондратович В.А., Лемеш В.А., Кондратенко Г.Г.	71
ОПЫТ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ МЕТОДОМ NGS У ПАЦИЕНТОВ С СОЛИДНЫМИ ОПУХОЛЯМИ ПО ОПУХОЛЕВОМУ МАТЕРИАЛУ И В ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ Лебедева А.А., Григорьева Т.В., Кузнецова О.А., Белова Е.В., Кавун А.И., Алиярова С.И., Веселовский Е.М., Трякин А.А., Федянин М.Ю., Милейко В.А., Иванов М.В.	73
STUDY OF POLYMORPHISM OF ICAM-1 GENE IN COLORECTAL CANCER A. Mokrane	74
СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ Карташова А.Д., Михайлец Э.С., Плотнокова Л.В., Полянничко А.М.	74
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА СYP450 СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПОЛУЧАВШИХ НЕОАДЪЮВАНТНУЮ ПОЛИХИМИОТЕРАПИЮ Кипень В.Н., Добыш О.И., Ходоронок Е.И., Хоров А.О., Лемеш В.А.	75
СООТНОШЕНИЕ СВЯЗАННОГО И НЕ СВЯЗАННОГО С МЕТАЛЛАМИ ТРАНСФЕРРИНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЯИЧНИКОВ Сачко А.М., Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Сыченкова Н.И., Болотникова О.И., Тиллиб С.В.	77
Раздел 4. ИНФЕКЦИИ С ВОЗДУШНО-КАПЕЛЬНЫМ, КОНТАКТНО-БЫТОВЫМ МЕХАНИЗМОМ ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЯ И ИХ ОСЛОЖНЕНИЯ	
ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ Горина Л.Г., Крылова Н.А., Раковская И.В., Гамова Н.А., Бархатова О.И.	78
ВЫЯВЛЕНИЕ АССОЦИАЦИЙ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ С ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ ДЕТСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ ОСП «КЛИНИЧЕСКИЙ ГОСПИТАЛЬ ИДК» АО «МЕДИЦИНСКАЯ КОМПАНИЯ ИДК» Хайретдинова Э.Б., Воронова Е.А., Никонорова И.В., Величко Х.А.	79
НАПРЯЖЕННОСТЬ ИММУНИТЕТА К КОРИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ СКРИНИНГА В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ Григорьева Т.Д., Белопольская М.А., Потанина Д.В., Дмитриев А.В., Яковлев А.А.	81
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ SARS-COV-2 В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ Резник В.И., Савосина Л.В., Лебедева Л.А., Жалейко З.П.	82
ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ Шевякова Е.А., Зыкова Т.А.	83
ИЗУЧЕНИЕ КОНСЕРВАТИВНЫХ И ВАРИАБЕЛЬНЫХ ЭПИТОПОВ В МОЛЕКУЛЕ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСОВ ГРИППА В С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ Сорокин Е.В., Царёва Т.Р., Кривицкая В.З., Петрова Е.Р., Грудинин М.П.	84

ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ У БОЛЬНЫХ КОРЬЮ

Малеев В.В., Алешина Н.И., Лазарева Е.Н., Астрина О.С., Наврузова Л.Н., Краснова С.В., Цветкова Н.А., Вдовина Е. Т. _____ 85

ГЕНОВАРИАНТЫ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР: СВЯЗЬ С КЛИНИЧЕСКИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА У ДЕТЕЙ

Попкова М.И., Уткин О.В., Филатова Е.Н., Брызгалова Д.А., Соболева Е.А., Сахарнов Н.А. _____ 86

ЭТИОЛОГИЯ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ НАСЕЛЕНИЯ Г. НОВЫЙ УРЕНГОЙ

Черемных Н.В. _____ 87

НОВЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ ГРИППА В/НОРВЕГИЯ/234/2019 ЯМАГАТСКОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ЛИНИИ

Царева Т.Р., Сорокин Е.В., Ажойчик Е.В., Флорен А.М., Грудинин М.П. _____ 89

ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К КОКЛЮШУ В РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ И ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОКЛЮША И ПАРАКОКЛЮША В 2022-2023.

Шипулина О.Ю., Абрамова М.С., Комова Д.М., Артеменко Э.С. _____ 90

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА КОРИ

Шипулина О.Ю., Абрамова М.С., Комова Д.М., Кузнецова И.В. _____ 92

Раздел 5. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИЗУЧЕНИИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА**СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ Е К МОЛЕКУЛЯРНЫМ АНТИГЕНАМ ГЕЛЬМИНТОВ ПРИ РАСПРОСТРАНЕННЫХ НЕМАТОДОЗАХ**

Агафонова Е.В., Решетникова И.Д., Троценко О.А., Смирнова Л.Р., Сафина Л.Ф., Камалова Э.Р. _____ 94

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАГЕНОМНЫХ СООБЩЕСТВ И ГЕНОМА КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМОГО ШТАММА HELICOBACTER PYLORI В РАЗВИТИИ АЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Воропаев Е.В., Зятьков А.А., Шафорост А.С., Осипкина О.В., Баранов О.Ю., Воропаева А.В. _____ 95

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ ЧАСТЬЮ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ДНК ПРОСТЕЙШИХ ПАРАЗИТОВ В ФЕКАЛИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Девятков А.А., Давыдова Е.Е., Лупарев А.Р., Полякова В.А., Толоконцева А.А., Шурыева А.К., Шипулин Г.А. _____ 96

ДЕТЕКЦИЯ ДИАРЕЕГЕННЫХ E.COLI У ОБЕЗЬЯН ВИДА МАКАК СУХУМСКОГО ПИТОМНИКА

Ардашелия С.Н., Джинджолия В.Г., Смыр С.Р., Агрба С.Л., Киласония Э.Ф., Аргун Э. Н., Аршба И.М., Полякова В.И., Агумава А.А. _____ 97

ФИЛОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ИЗУЧЕНИИ ЦИРКУЛЯЦИИ НОРОВИРУСОВ

Епифанова Н.В., Опарина С.В., Новикова Н.А. _____ 98

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ ГРАМ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ МЕХАНИЧЕСКОГО ЛИЗИСА ПЕСКОМ

Горохов И.А., Гончаров Н.Е., Полев Д.Е. _____ 99

АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ОСНОВНЫХ КЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ LISTERIA MONOCYTOGENES НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 1947-2023 ГГ.

Кичемазова Н.В., Зайцев С.С., Лаврухин М.С., Ляпина А.М., Ларионова О.С., Федорова В.А. _____ 101

УСТАНОВЛЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИЙ МЕЖДУ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ДНК УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ ФЛОРЫ СТЕНКИ КИШКИ И НАЛИЧИЕМ ОСЛОЖНЕНИЙ ДИВЕРТИКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ

Полюян О.С., Костюк С.А., Воробей А.В., Дыбов О.Г. _____ 102

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ЭНТЕРОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА С ДИФФЕРЕНЦИАЦИЕЙ ЭНТЕРОВИРУСА 68 ТИПА Полякова В.А., Лупарев А.Р., Давыдова Е.Е., Шуряева А.К., Толоконцева А.А., Девятов А.А., Гордукова М.А., Шипулин Г.А.	103
КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ Левашова О.А., Алексеева Н.Ю., Голикова О.А., Микуляк Н.И., Журавлев Д.И.	105
УСЛОВНО-ПАТОГЕННАЯ ФЛОРА КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ ДИВЕРТИКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ, ЕЕ ОСЛОЖНЕНИЙ И РЕЦИДИВОВ Полуян О.С., Костюк С.А., Воробей А.В., Дыбов О.Г.	106
РАЗРАБОТКА И ТЕСТИРОВАНИЕ МЕТОДИКИ ДЛЯ ПРОФИЛИРОВАНИЯ РЕПЕРТУАРА Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ Сикамов К.В., Горбачев А.Ю.	107
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОТАВИРУСОВ: ДОМИНИРОВАНИЕ РЕАССОРТАНТНОГО ВАРИАНТА В НИЖНЕМ НОВГОРОДЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ С ВАКЦИННЫМИ ШТАММАМИ Сашина Т.А., Морозова О.В., Великжанина Е.И., Епифанова Н.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А.	109
РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРНОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДА AEROMONAS VERONII МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (LAMP) Феоктистова Н.А., Минаева А.Н., Мاستиленко А.В., Богданов И.И., Ломакин А.А., Нафеев А.А.	110
ПЕРСПЕКТИВЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ Толоконцева А.А., Шуряева А.К., Давыдова Е.Е., Полякова В.А., Лупарев А.Р., Девятов А.А., Гордукова М.А., Шипулин Г.А.	111
Раздел 6. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ОСОБО ОПАСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ	
СОХРАНЕНИЕ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В МИКРОКОСМАХ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА С.В. Титова, А.А. Герасименко, Е.А. Меньшикова, С.О. Водопьянов., Н.А. Селянская	114
Раздел 7. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИЙ ОРГАНОВ РЕПРОДУКЦИИ	
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ, КУЛЬТУРАЛЬНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ Бадиков В.Д., Борухович Д.Г., Захарова О.Г., Борухович Л.С.	116
ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДНК-НАНОСЕНСОРОВ И ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИППП Горбенко Д.А., Рубель М.С., Филатов П.В., Афанасьева А.А., Дададжанов Д.Р.	117
ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ГИДРОГЕЛЕВЫЕ БИОЧИПЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ УСТОЙЧИВОСТИ NEISSERIA GONORRHOEAЕ К АКТУАЛЬНЫМ АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ Кандинов И.Д., Кравцов Д.В., Дементьева Е.И., Кубанов А.А., Соломка В.С., Шагабиева Ю.З., Дерябин Д.Г., Филиппова М.А., Шаскольский Б.Л., Грядунов Д.А.	118
ОСОБЕННОСТИ ВИДОВОГО СОСТАВА ЛАКТОБАЦИЛЛ В ОТДЕЛЯЕМОМ ВЛАГАЛИЩА У ПАЦИЕНТОК С ЦЕРВИКАЛЬНЫМИ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ Костюк С.А., Пинчук Т.В., Полуян О.С., Можейко Л.Ф., Лямцева А.К.	119

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НИЖНИХ ОТДЕЛОВ МОЧЕПОЛОВОГО ТРАКТА У МУЖЧИН МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ Болотина Е.С., Яковлев И.М., Антипин Д.А., Дюкина Т.В., Шуйтасова Л.М.	121
РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К МАКРОЛИДАМ И ФТОРХИНОЛОНАМ MYCOPLASMA GENITALIUM, ВЫДЕЛЕННЫХ У БЕРЕМЕННЫХ ТУЛЫ И СМОЛЕНСКА Авчинникова Д.А., Эйдельштейн И.А., Покусаева В.Н., Дехнич А.В., Руднева Н.С.	122
ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ФТОРХИНОЛОНАМ В КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТАХ MYCOPLASMA GENITALIUM, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ ГОРОДА МИНСКА РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ ЗА ПЕРИОД С МАРТА ПО НОЯБРЬ 2022 ГОДА Маджарова О.А., Эйдельштейн И.А., Абельская И.С., Галицкая С.С., Качанко Е.Ф., Козаченко М.Г., Романов А.В., Козлов Р.С.	123
IDENTIFICATION OF GENETIC MARKERS OF RESISTANCE TO FLUOROQUINOLONES IN MYCOPLASMA GENITALIUM CLINICAL ISOLATES FROM PATIENTS IN MINSK, REPUBLIC OF BELARUS FOR THE PERIOD FROM MARCH TO NOVEMBER 2022 Madzharova O.A., Edelstein I.A., Abelskaya I.S., Galitskaya S.S., Kachanko E.F., Kozachenko M.G., Romanov A.V., Kozlov R.S.	123
Раздел 8. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ВНУТРИУТРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ	
ВЛИЯНИЕ COVID-19, ПЕРЕНЕСЕННОГО ЖЕНЩИНАМИ РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА, НА ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К LISTERIA MONOCYTOGENES, ПРИВОДЯЩЕЙ К ЛИСТЕРИОЗУ НОВОРОЖДЕННЫХ Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И., Кустова М.А., Карпова Т.И., Мелкумян А.Р., Климова Е.А., Тартаковский И.С.	125
Раздел 9. ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА В КРИМИНАЛИСТИКЕ И СУДЕБНОЙ МЕДИЦИНЕ	
ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТНИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ЛЮДЕЙ ПО РАЗЛИЧНЫМ НАБОРАМ ДНК-МАРКЕРОВ Харьков В.Н., Вагайцева К.В., Колесников Н.А., Степанов В.А.	127
МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ НАБОР ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ 23 ПОЛИМОРФНЫХ STR-МАРКЕРОВ НЕ ВХОДЯЩИХ В МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ Вагайцева К.В., Скалин М.Д., Колесников Н.А., Харьков В.Н., Раджабов М.О., Степанов В.А.	128
ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЛИМОРФИЗМА AX-116263147 ДЛЯ РАЗЛИЧЕНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДОВ SUS SCROFA SCROFA И SUS SCROFA DOMESTICUS Кипень В.Н., Патрин М.М.	129
ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОНОЗИГОТНЫХ БЛИЗНЕЦОВ В СУДЕБНОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ (СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ) Перепечина И.О.	130
ПОИСК ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ С ВЫСОКИМ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИМ ПОТЕНЦИАЛОМ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДОВ CANIS LUPUS И CANIS LUPUS FAMILIARIS Кипень В.Н.	132
СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДНК ИДЕНТИФИКАЦИИ, ДНК ФЕНОТИПИРОВАНИЯ Тазетдинов А.М., Тахирова З.Р., Хуснутдинова Э.К.	133
БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХЛОРОПЛАСТНЫХ МАРКЕРОВ ДНК- ШТРИХКОДИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА PINUS В КРИМИНАЛИСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ Верчук А.Н.	135

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯДЕРНЫХ МАРКЕРОВ ITS-РЕГИОНА ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА PINUS В КРИМИНАЛИСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ Верчук А.Н.	136
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ И ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ РОДА РАСТЕНИЙ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ ИНТЕРЕС В ПРИКЛАДНОЙ И СУДЕБНОЙ ПАЛИНОЛОГИИ Верчук А.Н., Кильчевский А.В.	138
ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ СУДЕБНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ Верчук А.Н.	139
Раздел 10. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ГЕНЕТИКЕ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	
МУТАЦИИ ГЕНА FGD1 (FACIOGENITAL DYSPLASIA) ЗАМЕДЛЯЮТ ПОСТ ГОЛЬДЖИ ТРАНСПОРТ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОТЕИНОВ И РЕГУЛИРУЮТ ДИНАМИКУ МИКРОТРУБОЧЕК Егоров М.В., Полищук Р.С.	140
СОЧЕТАНИЕ МУТАЦИЙ, ПРИВОДЯЩИХ К ПРЕЖДЕВРЕМЕННОМУ СТОП-КОДОНУ В ГЕНЕ TTN, И МИССЕНС-МУТАЦИЙ В ГЕНЕ RYR2 У ПАЦИЕНТОВ С НЕКОМПАКТНЫМ МИОКАРДОМ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА Чакова Н.Н., Комиссарова С.М., Ниязова С.С., Долматович Т.В., Ринейская Н.М.	141
СПЕКТР МУТАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С АРИТМОГЕННОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ Чакова Н.Н., Комиссарова С.М., Долматович Т.В., Ниязова С.С., Ефимова А.А.	142
НОВЫЕ ПАТОГЕННЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА БЕТА-ГЛОБИНА У ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ ИЗ РОССИИ И БЛИЖНЕГО ЗАРУБЕЖЬЯ Селиванова Д. С., Щемелева Е. Ю., Саломашкина В. В., Сурин В. Л.	144
АНАЛИЗ ВСТРЕЧАЕМОСТИ НОСИТЕЛЬСТВА ЧАСТЫХ АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, КАК ОБОСНОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА ДОНОРОВ ГАМЕТ В ВРТ Щелочков А.М., Рящина А.Н.	145
NGS-ПАНЕЛЬ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ДИСЛИПИДЕМИЙ – ПЕДИАТРИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ СИТОСТЕРОЛЕМИИ Пчелина С.Н., Захарова Е.Ю., Линькова С.В., Мирошникова В.В.	146
ПАТОГЕННЫЕ ВАРИАНТЫ В ГЕНАХ PKD1, PKD2, HNF1b, PKHD1, PRRP1, TMEM67, INVS И КЛИНИЧЕСКИЙ ФЕНОТИП НАСЛЕДСТВЕННЫХ КИСТОЗОВ ПОЧЕК У 22 ДЕТЕЙ Андреева Э.Ф., Савенкова Н.Д.	147
ЧАСТЫЕ МУТАЦИИ ГЕНА CFTR У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИЦИДОЗОМ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ Комова Е.Г., Пинегина Ю.С., Коренева Г.В.	149
МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ЗАМЕН ИНВАРИАНТНОГО Cys1079 НА Phe ИЛИ Gly В МЕДЬ-ТРАНСПОРТНОЙ АТФ-азе АТР7В, ВЕДУЩИХ К РАЗВИТИЮ БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА ИЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА Санькова Т.П., Ильичева Е.Ю., Карпенко М.Н., Муружева З.М., Пучкова Л.В.	150
ГЕНЕТИКА ЛОБНО-ВИСОЧНОЙ ДЕМЕНЦИИ Ю.А. Шпилюкова, Е.Ю. Федотова, Н.Ю. Абрамьчева, С.Н. Иллариошкин	151
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ НОСИТЕЛЬСТВА МОНОГЕННОЙ ПАТОЛОГИИ СРЕДИ БЕСПЛОДНЫХ ПАР В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ Дерябина С.С., Лагутина О.В., Кудрявцева Е.В.	151

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ПЦР-РВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГОМОЗИГОТНОЙ ДЕЛЕЦИИ ЭКЗОНА 7 ГЕНА SMN1 В УЗБЕКИСТАНЕ Воронцов Р.Н., Касимов А.Э., Дё К.Г., Херай Т.Р.	152
АЛГОРИТМЫ ДНК-ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ МОЗЖЕЧКОВЫХ АТАКСИЙ Нужный Е.П., Абрамычева Н.Ю., Ключников С.А., Протопопова А.О., Иллариошкин С.Н.	153
АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ В ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА UGTR1, АССОЦИИРОВАННОЙ С СИНДРОМОМ ЖИЛЬБЕРА, У ДЕТЕЙ С ГИПЕРБИЛИРУБИНЕМИЕЙ Перевезенцев О.А., Мамедов И.С.	154
DEPDC5 – СЕМЕЙНАЯ ФОКАЛЬНАЯ ЭПИЛЕПСИЯ (КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ) Кожанова Т.В., Жилина С.С., Сушко Л.М., Осипова К.В., Крапивкин А.И., Заваденко Н.Н.	155
ПОТЕРЯ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ ГЕНОВ SDHX ПРИ КАРОТИДНЫХ ПАРААНГИОМАХ Маркова Д.С., Аюпова А.Ф., Ланцова М.С., Федорова М.С., Павлов В.С., Снежкина А.В., Кудрявцева А.В.	155
СЛУЧАИ ГЕННОЙ КОНВЕРСИИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ В РОССИЙСКОЙ ВЫБОРКЕ ПАЦИЕНТОВ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА БОЛЕЗНЬ ВИЛЛЕБРАНДА Чернецкая Д.М., Сурин В.Л., Саломашкина В.В., Пшеничникова О.С., Яковлева Е.В., Лихачева Е.А., Зозуля Н.И., Шабанова Е.С.	156
ДИАГНОСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭПИЛЕПСИИ У ДЕТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ Даниленко Н.Г., Куликова С.Л., Иванова А.С., Александрович В.В., Сивицкая Л.Н., Синявская М.Г.	157
ТРЕХПРАЙМЕРНАЯ ПЦР В ДИАГНОСТИКЕ МИОТОНИЧЕСКИХ ДИСТРОФИЙ Гусина А.А., Марникова Д.П., Мясников С.О.	158
 Раздел 11. НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ И ВИЧ-АССОЦИИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИЙ	
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ ЭПИДЕМИИ ВИЧ/СПИД В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ. НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДАВНОСТИ ЗАРАЖЕНИЯ И МИНИМИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ Шемшур А.Б., Лебедев П.В., Кулагин В.В., Хотелева Л.В., Топольская С.В., Чудайкина Н.Н., Шемшур Т.А., Шлыкова А.В., Кириченко А.А., Киреев Д.Е.	159
МЕТОД ОЦЕНКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ ВИЧ В КЛЕТКЕ С ПОМОЩЬЮ ПАРАМЕТРОВ ТЕКСТУРЫ ХАРАЛИКА И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ Елфимов К.А., Готфрид Л.Г., Гашникова М.П., Бабошко Д.А., Гашникова Н.М.	160
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ВИЧ, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ РАЗЛИЧНОГО БИОМАТЕРИАЛА Панова А.Е., Винокуров А.С., Пай Г.В., Казюлина А.А., Байбеков К.С., Веселова Е.В., Васильева И.А.	161
ПОРОГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРЕДАЮЩЕЙСЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ Ревизор А.О., Пономарева О.А., Плотникова Ю.К., Шулунов А.А., Черкасов Н.Н., Вершинин П.Е., Наумова Е.С., Кузнецова Е.А., Танхаева А.И., Полякова П.А.	162
АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ОПЫТОМ ПРИЕМА ИНГИБИТОРОВ ИНТЕГРАЗЫ Монахов Н.Э., Ермаков А.И., Обижаева Е.С.	164
 Раздел 12. МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ	
АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗА – БИОМАРКЕР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПЛЕВРИТОВ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ Дьякова М.Е., Владимиров К.Б., Эсмедляева Д.С., Яблонский П.К.	165

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОВ PE_PGRS MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS В.В. Слизень, Л.К. Суркова	165
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ КУ-ЛИХОРАДКИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЁЗОМ Бондаренко Е.И., Демина О.К., Аглетдинов Э.Ф., Калугина Ю.А., Шварц Я.Ш., Ставицкая Н.В., Грачева А.Н., Панова А.Е., Варнавская О.В., Офицеров В.И.	166
ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS И ПРИЕМА АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ НА ИСХОДЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-АССОЦИИРОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ Герасимова А.А., Вязовая А.А., Мокроусов И.В., Пантелеев А.М., Журавлев В.Ю., Соловьева Н.С.	168
ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ДНК-НАНОСЕНСОРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В GC БОГАТЫХ УЧАСТКАХ ГЕНОМА НА ПРИМЕРЕ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Луганская П. С., Рубель М.С., Покатова О.Ю., Старкова П.А., Колпашиков Д.М.	169
ДИНАМИКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ШТАММОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ГЕНЕТИЧЕСКОГО СЕМЕЙСТВА BEIJING В БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ Тюрина Е.Б., Павленко Е.В., Круть И.В.	170
ДИСБИОЗ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ КАК ПРЕДИКТОР НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ИСХОДА ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ Юнусбаева М.М., Бородина Л. Я., Закирова А. М., Терентьева Д. Р., Юнусбаев Б. Б.	171
МАРКЕРЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ В ПРОГНОЗЕ ВЕНТИЛЯЦИОННЫХ НАРУШЕНИЙ РЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ Эсмедяева Д.С., Алексеева Н.П., Кирюхина Л.Д., Дьякова М.Е.	172
ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА VDR ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ И ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ Лавряшина М.Б., Тхоренко Б.А., Мейер А.В., Холодов А.А., Пьянзова Т.В.	173
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА Морозов К.В., Шматов Ф.М., Шипулин Г.А., Черняева Е.Н.	174
РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ УСОВЕРШЕНСТВОВАННОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX К РИФАМПИЦИНУ И ИЗОНИАЗИДУ, МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ Миколович Ю.Л., Зайцева А.И., Шипулин Г.А.	175
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ РЕТИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ И ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ Тхоренко Б.А., Казуль Г.А., Киприянова Н.А., Пьянзова Т.В., Лавряшина М.Б.	176
АНАЛИЗ МИНИСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ИЗОЛЯТОВ MYCOBACTERIUM BOVIS/M. CAPRAE В БОЛГАРИИ Терентьева Д.Р., Савова-Лалковска Т., Димитрова А., Боновска М., Мокроусов И.В., Вылчева В.	178
УНИФИЦИРОВАННАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО КОМПЛЕКСА: ОТ ФИЛОГЕНОМИКИ К КЛИНИКЕ Шитиков Е.А., Беспярых Д.А., Зайчикова М.В.	179

Раздел 13. ФАРМАКОГЕНЕТИКА И ФАРМАКОГЕНОМИКА

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА МЕТАБОЛИЗМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА У ПАЦИЕНТОВ КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ Абдрахманова С.А., Фахрадиев И.Р., Качиева З., Жангазиева К.Х., Туякова Н.С., Саусакова С.Б.	180
---	-----

СВЯЗЬ ТИПА МЕТАБОЛИЗМА, УРОВНЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИПСИХОТИКОВ В КРОВИ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ИЗОФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМА P-450 ПРИ ШИЗОФРЕНИИ Голубева Т.С., Докукина Т.В., Голоенко И.М., Обьедков В.Г., Гребень Н.Ф., Сергеев Г.В.2, Бокуть О.С.2, Походня Ю.Г.2, Сяхович В.Э.3, Походня Е.Н.	181
ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА МЕДЛЕННЫХ АЛЛЕЛЕЙ CYP2C9 СРЕДИ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ВЫБОРКИ ЖИТЕЛЕЙ НОВОСИБИРСКА Комова Е.Г.	182
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЕРСониФИЦИРОВАННОГО ПОДХОДА К УПОТРЕБЛЕНИЮ КОФЕИН-СОДЕРЖАЩИХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ СПОРТСМЕНАМИ ЦИКЛИЧЕСКИХ И ИГРОВЫХ ВИДОВ СПОРТА Морозик П.М., Саванович И.И., Малёваная И.А., Румянцева В.Д., Сухан Т.О., Амелянович М.Д., Шибек О.В.	183
РИФАМПИЦИН СНИЖАЕТ УРОВЕНЬ MIR-LET-7B В ГИППОКАМПе У ДЛИТЕЛЬНО АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ КРЫС Ереско С.О., Шамаева С.А., Айрапетов М.И.	184
ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА ABC-ТРАНСПОРТЕРОВ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМАХ ХИМИОТЕРАПИИ Кипень В.Н., Добыш О.И., Ходоронок Е.И., Хоров А.О., Лемеш В.А.	185
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ AVCC1 И CYP1B1 АССОЦИИРОВАН С РАЗВИТИЕМ КАРДИОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОМПЛЕКСНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Кипень В.Н., Добыш О.Г., Черневская М.В., Черняк С.В., Павлова О.С., Ковш Е.В., Лемеш В.А.	186
Раздел 14. ГЕНЕТИКА МУЛЬТИФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	
АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОМПОНЕНТЫ НОРМАЛЬНОЙ ВАРИАбельНОСТИ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА В ПОЖИЛОМ ВОЗРАСТЕ Бочарова А.В., Вагайцева К.В., Марусин А.В., Макеева О.А., Степанов В.А.	187
КОРРЕЛЯЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ СИНТЕЗ БЕЛКОВ ПРЕДИКТОРОВ СУИЦИДА, В КРОВИ И СЛЮНЕ Глинкина Т.В., Костюк С.А., Руденкова Т.В., Полуян О.С., Лямцева А.К., Давидовский С.В.	189
АРОЕ И ЛИКВОРНЫЕ БИОМАРКЕРЫ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА Невзорова К.В., Федотова Е.Ю., Шпилюкова Ю.А., Проценко А.Р., Шабалина А.А., Иллариошкин С.Н.	190
АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА GSS С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ПСОРИАЗА: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ Е.В. Ефанова, Р.В. Саранюк, О.Ю. Бушуева, А.В. Полоников	191
ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ FSNB 2BP DEL VAL79GLUFS И KITLG C80441T С СИНДРОМОМ ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ Зыкова Г.С., Елисеева Л.В., Лянгасова О.В., Александрова А.А.	191
ОСОБЕННОСТИ СВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА RS5443 ГЕНА GNB3 И ПОЛИМОРФИЗМА RS1801282 ГЕНА PPARG2 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА Глинкина Т.В., Костюк С.А., Руденкова Т.В., Полуян О.С., Лямцева А.К., Штонда М.В., Акола Т.В.	192
ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГЕНОВ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В ГЕНЕЗЕ ЗАДЕРЖКИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА Алсет Д.М., Сергеева А.Д., Покудина И.О., Бутенко Е.В., Шкурят Т.П.	193
ЭПИГЕНОМИКА РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА: МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК CD4+ И CD14+ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ОБОСТРЕНИИ И РЕМИССИИ Киселев И.С., Кулакова О.Г., Кабилов М.Р., Батурина О.А., Фаворова О.О.	194
ГЕНЫ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНОЙ СИСТЕМЫ В ФОРМИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА Кочетова О.В., Авзалетдинова Д.Ш., Булгакова А., Ларкина А.П., Корытина Г.Ф.	195

РОЛЬ ГАПЛОТИПА E4 ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА E В РИСКЕ РАЗВИТИЯ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ЭНДОМЕТРИЯ Иванова Т.И., Хорохорина В.А., Ткаченко Б.Э., Мкртчян Л.С., Крикунова Л.И., Замулаева И.А.	197
ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ANKK1, LTA и TNF-α У ПАЦИЕНТОВ С ПАРАНОИДНОЙ ШИЗОФРЕНИЕЙ ИЗ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ Вольчик В.В., Машкина Е.В., Солдаткин В.А.	198
АНАЛИЗ АССОЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВАРИАНТА NOS3 -786 T>C ГЕНА NO СИНТАЗЫ 3 С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К РАЗВИТИЮ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ Перевезенцев О.А., Пименова В.В., Бурцев Д.В.	199
АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПАНЕЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВАЗОВАГАЛЬНЫХ ОБМОРОКОВ Матвеева Н.А., Титов Б.В., Базылева Е.А., Певзнер А.В., Фаворова О.О.	200
ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗЫ, ИХ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И БРОНХИАЛЬНАЯ АСТМА У ДЕТЕЙ Игнатиади Ю.В., Машкина Е.В., Лебедеико А.А., Семерник О.Е.	201
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА SIRT1 И ПАПИЛОМАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ Машкина Е.В., Вольчик В.В.	202
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ И ИХ КОМБИНАЦИИ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Полуконова Н.В., Фомкин Р.Н., Демин А.Г., Пылаев Т.Е., Мезиров Г.Г., Мудрак Д.А., Бучарская А.Б., Воронина Е.С., Маслякова Г.Н., Попков В.М.	203
РАЗРАБОТКА И КЛИНИЧЕСКАЯ АПРОБАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ НОРМАЛИЗОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КОЛЛАГЕНА И РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕРИОДОНТА Полюян О.С., Костюк С.А., Мельникова Т.Ю., Юдина Н.А.	204
ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ФОРМИРОВАНИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ, У ПАЦИЕНТОВ С ДИВЕРТИКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ Полюян О.С., Костюк С.А., Воробей А.В., Дыбов О.Г.	205
МИНИСАТЕЛЛИТНЫЕ ПОВТОРЫ ГЕНОВ VDKRB2, 5-НТТ И DAT1 КАК БИОМАРКЕРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ И ИНФАРКТА МИОКАРДА У ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА Сучкова И.О., Дергачева Н.И., Соколова В.А., Сасина Л.К., Фирова Э.М., Мамедова З.Э., Мещерякова Н.Г., Агибалова Л.Т., Шурпач С.Л., Муружева З.М., Татаринцев А.Е., Паткин Е.Л.	207
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА rs1800449 (LOX G473A) СРЕДИ БОЛЬНЫХ ПОДРОСТКОВЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ СКОЛИОЗОМ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ Буслов К.Г., Хальчицкий С.Е., Грачева Ю.А., Филиппова А.Н., Виссарионов С.В.	208
ВКЛАД ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА GSTO1 В ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ПСОРИАЗУ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ Саранюк Р.В., Бушуева О.Ю., Ефанова Е.В., Полоникова А.А., Полоников А.В.	209
ЗНАЧЕНИЕ СОЧЕТАНИЯ НЕКОТОРЫХ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК У ДЕТЕЙ Седашкина О.А., Порецкова Г.Ю., Маковецкая Г.А.	210
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА GIPR И УРОВЕНЬ ИНСУЛИНА У ДЕТЕЙ С. Тоннанг Момо, Е.В. Машкина	210

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ НЕРАВНОВЕСИЯ ПО СЦЕПЛЕНИЮ И АССОЦИИИ ПОЛИМОРФНЫХ АЛЛЕЛЕЙ –819T/C rs1800871 и –592C/A rs1800872 ГЕНА IL10 С ТРУБНЫМ ФАКТОРОМ БЕСПЛОДИЯ Бутенко Е.В., Диденко Я.В., Лянгасова О.В., Ломтева С.В.	211
УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК TUG1 В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНИ Васильева А.В., Курбатова И.В., Топчиева Л.В., Дуданова О.П., Шиповская А.А.	211
ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ КАДГЕРИНОВ И ИНТЕГРИНОВ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ Суходолова Т.А., Машкина Е.В.	213
СИНДРОМ «СЕРДЦА АТЛЕТА» У МОЛОДЫХ СПОРТСМЕНОВ И ИЗОЛИРОВАННАЯ СИСТОЛИЧЕСКАЯ ГИПЕРТОНИЯ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МИНИМАЛЬНОГО НАБОРА ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ Коломейчук С.Н., Путилов А.А., Мейгал А.Ю., Морозов А.В., Зайцева И.А., Воронин К.А., Межакова М.С., Марков А.А., Губин Д.Г.	214
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ СВЯЗИ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА RS5760489 ГЕНА GGT 1 И РИСКА РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА Дроздова Е.Л., Солодилова М.А., Полоникоа А.А.	215
ТРАНСКРИПТОМИКА И ГЕНОМИКА ПРЕЭКЛАМПСИИ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ Трифоновна Е.А., Зарубин А.И., Бабовская А.А., Степанов В.А.	217
ЭКСПРЕССИЯ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК MALAT1, GAS5, TUG1 ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ Топчиева Л.В., Корнева В.А.	218
ПРЕДИКТИВНЫЕ АСПЕКТЫ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА VDR ПРИ РАЗВИТИИ ОСЛОЖНЕНИЙ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ У БОЛЬНЫХ НА ФОНЕ ПРИЕМА СТАТИНОВ Коваленко А.В., Никитина В.В.	219
ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА VDR В ЛОКАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ-КУЗБАССА Имекина Д.О., Тхоренко Б.А., Мейер А.В., Ульянова М.В., Лавряшина М.Б.	220
РОЛЬ ЦИРКАДИАННЫХ ФАКТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ Коломейчук С.Н., Коростовцева Л.С., Кемстач В.В., Осипенко С.И., Бочкарев М.В., Шадрунова В.В., Заброда Е.А., Железняков В.С., Мокин Е.Н., Свиричев Ю.В.	221
ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМА RS174583 ГЕНА FADS2 У ПАЦИЕНТОВ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И ОЖИРЕНИЕМ, ПРОЖИВАЮЩИХ В МОСКОВСКОМ РЕГИОНЕ Пилипенко В.В., Шарафетдинов Х.Х., Плотникова О.А., Алексеева Р.И., Сорокина Е.Ю.	222
ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОМАРКЕРОВ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА СРЕДИ ДВУХЛОКУСНЫХ ГАПЛОТИПОВ HLA-DRB1 ~ 7488 IL-17F У РУССКИХ ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ Шмелькова Д.М., Сташкевич Д.С., Девальд И.В., Хромова Е.Б., Сулова Т.А.	223
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА КАТАЛАЗЫ У ДЕТЕЙ С ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА Шкурят М.А., Машкина Е.В.	224
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ TNF-ЗАВИСИМОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ АПОПТОЗА В ПОЗДНЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА Эрдман В.В., Туктарова И.А., Тимашева Я.Р., Насибуллин Т.Р.	225
РОЛЬ ГЕНОВ MTRR И ADD1 И НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В РАЗВИТИИ ПРЕЭКЛАМПСИИ Бордаева О.Ю., Алсет Д., Кулаева Е.Д., Деревянчук Е.Г.	226

ЭКСПРЕССИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК LNCRNA-H19, LNCRNA-MALAT1, LNCRNA-MEG3, LNCRNA-DNM3OS, LNCRNA-TP53TG1, LINC00342 У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ Корытина Г.Ф., Маркелов В.А., Гибадуллин И.А., Зулкарнеев Ш.Р., Азнабаева Ю.Г., Ахмадишина Л., Кочетова О.В., Хуснутдинова Н.Н., Ларкина А.П., Авзалетдинов А.М., Загидуллин Н.Ш.	227
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА CYP450 СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ПРИ НАЗНАЧЕНИИ ДВОЙНОЙ АНТИТРОМБОЦИТАРНОЙ ТЕРАПИИ Кипень В.Н., Зотова О.В., Добыш О.И., Королева Т.С., Бейманов А.Э., Стельмашок В.И., Лемеш В.А.	228
REPLICATIVE ASSOCIATIVE ANALYSIS OF 45 GENETIC VARIANTS (SNV) THAT HAVE FOUND ASSOCIATIONS WITH BEHAVIORAL DEVIATIONS, WITH THE SUSCEPTIBILITY TO SCHIZOPHRENIA IN THE RUSSIAN POPULATION Andrey V. Marusin, Maria G. Swarovskaja, Anna V. Bocharova, Ksenia V. Vagaitseva, Alexander N. Kornetov, Svetlana A. Ivanova, Oksana A. Makeeva, Vadim A. Stepanov	231
ИДИОПАТИЧЕСКИЙ ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ И COVID-19-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ: РОЛЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В МОЛЕКУЛЯРНОМ ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ Зулкарнеев Ш.Р., Корытина Г.Ф., Маркелов В.А., Гибадуллин И.А., Зулкарнеев Р.Х., Авзалетдинов А.М., Загидуллин Н.Ш.	232
ПОИСК ИНФОРМАТИВНЫХ ПРЕДИКТОРОВ ИНФАРКТА МИОКАРДА ПО СОЧЕТАНИЯМ ПОЛИМОРФНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ ГЕНОВ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА, АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И АПОПТОЗА Насибуллин Т.Р., Тимашева Я.Р., Эрдман В.В., Туктарова И.А., Корытина Г.Ф.	233
Раздел 15. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ	
ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРОМА БОЛЬШОГО ПОДКОВОНОСА (RHINOLOPHUS FERRUMEQUINUM), СЕВЕРО-ВОСТОЧНЫЙ КАВКАЗ, ДАГЕСТАН, 2023 Алексеев А.Ю., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Шаршов К.А., Хозяинова А.А.З, Жигалин А.В., Логинова А.М., Гаджиев А.А., Шестопалов А.М.	235
ЗАРАЖЕННОСТЬ ПАТОГЕНАМИ ИКСОДИД, СОБРАННЫХ НА ПАСТБИЩАХ РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ Щучинова Л.Д., Бондаренко Е.И., Щучинов Л.В., Ечешева А.В., Яковлева Н.А., Черткова Е.П.	236
ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ТРИМЕРИЗОВАННОГО ВАРИАНТА ПОВЕРХНОСТНОГО ГЛИКОПРОТЕИНА GPC ВИРУСА ЛАССА ПОЛУЧЕННОГО ПРИ ПОМОЩИ КЛЕТОК СНО-К1 Волкова Н.В., Арипов В.С., Исаева А.А., Пьянков О.В., Ильичев А.А., Пьянков С.А., Щербаков Д.Н.	237
ДОЛЯ КОКСИЕЛЛЁЗА СРЕДИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЯВЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С ЛИХОРАДКОЙ НЕЯСНОГО ГЕНЕЗА В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ Бондаренко Е.И., Вяжевич А.Н., Демина О.К., Офицеров В.И., Позднякова Л.Л., Краснова Е.И.	238
АНАЛИЗ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ DERMASENTOR RETICULATUS ПАТОГЕННЫМИ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА РИККЕТСИЯМИ В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ Воронкова О.В., Романенко В.Н., Симакова А.В., Есимова И.Е., Мотлохова Е.А., Чернышов Н.А., Хасанова Р.Р.	240
ВЫЯВЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА р66 У ИЗОЛЯТОВ ОТ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ – РЕЗЕРВУАРНЫХ ХОЗЯЕВ BORRELIA BAVARIENSIS Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б.	241
ДЕСЯТИЛЕТНИЙ МОНИТОРИНГ СОЧЕТАННЫХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, В ПРИБАЙКАЛЬЕ Мельникова О.В., Лопатовская К.В., Трушина Ю.Н., Адельшин Р.В., Яковчиц Н.В., Андаев Е.И.	242
СЕГМЕНТИРОВАННЫЕ ФЛАВИПОДОБНЫЕ ВИРУСЫ, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ Холодилов И.С., Белова О.А., Морозкин Е.С., Литов А.Г., Макенов М.Т., Журенкова О.Б., Карань Л.С., Карганова Г.Г.	244

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА E ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БУРЯТИЯ Лопатовская К.В., Бондарюк А.Н., Мельникова О.В., Андаев Е.И.	244
ПАТОЛОГИЯ ЭУТОПИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИЯ У ЖЕНЩИН С СУПЕРИНВАЗИОННЫМ ОПИСТОРХОЗОМ: ЖЕЛЕЗИСТАЯ ГИПЕРПЛАЗИЯ Хадиева Е.Д., Брынза Н.С., Бычков В.Г., Морозов Е.Н., Мишагин В.П., Лазарев С.Д., Платицина О.В.	245
ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГУМАНИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛА, НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО ВИРУС ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА Несмеянова В.С., Исаева А.А., Протопопова Е.В., Святченко В.А., Шаньшин Д. В., Волосникова Е.А., Есина Т. И., Локтев В. Б., Щербачев Д.Н.	246
СЕГМЕНТИРОВАННЫЕ ФЛАВИПОДОБНЫЕ ВИРУСЫ, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ Холодилов И.С., Белова О.А., Морозкин Е.С., Литов А.Г., Макенов М.Т., Журенкова О.Б., Карань Л.С., Карганова Г.Г.	247
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ МОНИТОРИНГЕ ЗА ГРИППОМ ПТИЦ НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РОССИИ Лебедева Л.А., Савосина Л.В., Жалейко З.П., Резник В.И.	248
НОВЫЕ ЗООНОЗНЫЕ ВИРУСЫ, ИЗОЛИРОВАННЫЕ ОТ ГРЫЗУНОВ И НАСЕКОМОЯДНЫХ, ОБНАРУЖЕННЫЕ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ Булычева Ю. И., Бутенко А. М., Маркина Т. А., Альховский С. В.	249
CLINICAL AND ANALYTICAL EFFICIENCIES EVALUATION OF “MV AMP PS” RT- QPCR ASSAY FOR MEASLES VIRUS DETECTION Chayeb V.A., Shirobokova S.A., Shabalina A.V., Dolgova A.S., Dedkov V.G.	250
Раздел 16. ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ И ПРОБЛЕМЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ	
РАЗРАБОТКА ТЕСТОВ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК CANDIDA ALBICANS, CANDIDA GLABRATA, CANDIDA KRUSEI И CANDIDA AURIS Глущенко Е.Е., Данилов Д.И., Савочкина Ю.А., Данилова В.С., Шипулин Г.А.	252
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ PSEUDOMONAS AERUGINOSA ST308 С КАРБАПЕНЕМАЗОЙ NDM-1 Шаповалова В.В., Чулкова П.С., Агеевец В.А., Авдеева А.А., Нурмуқанова В.А., Мацвай А.Д., Плешков В.Ю., Попенко Л.Н., Савочкина Ю.А., Шипулин Г.А., Сидоренко С.В.	253
РАЗРАБОТКА ТЕСТА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕНОВ МЕТАЛЛО-β-ЛАКТАМАЗ ГРУППЫ VIM И СЕРИНОВЫХ КАРБАПЕНЕМАЗ ГРУППЫ GES-5 У PSEUDOMONAS AERUGINOSA МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ Глущенко Е.Е., Савочкина Ю.А., Данилов Д.И., Шипулин Г.А.	254
МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИМИКОТИКАМ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ШТАММОВ CANDIDA PARAPSILOSIS Сидоренко В.А., Юсупова Е.П., Мартынова А.В.	255
ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К КАРБАПЕНЕМАМ ШТАММОВ KLEBSIELLA PNEUMONIAE, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ СОБАК И КОШЕК В Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГ Гишян А.А., Забровская А.В.	256
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДЕПОЛИМЕРАЗЫ БАКТЕРИОФАГА VB_KPNP_NER40 Оснач.В.А., Шабалина А.В., Долгова А.С.	257

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБОТАННОГО ТЕСТА НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ ГРУПП NDM, ОХА-48 И КРС ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ЕГО В ДИАГНОСТИКЕ НОЗОКОМИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ Данилов Д.И., Глуценко Е.Е., Савочкина Ю.А., Данилова В.С., Стрелкова Д.А., Рачина С.А., Кулешов В.Г.З, Шипулин Г.А.	258
МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ НА ОСНОВЕ БИОЧИПОВ В 96-ЛУНОЧНЫХ ПЛАНШЕТАХ Рубцова М.Ю., Филиппова А.А., Кузина Е.С., Фурсова Н.К., Уляшова М.М., Преснова Г.В., Григоренко В.Г., Егоров А.М.	260
ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ В ИЗОЛЯТАХ KLEBSIELLA PNEUMONIAE, ВЫДЕЛЕННЫХ В РАМКАХ ВETERИНАРНОГО МОНИТОРИНГА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ Макавчик С.А., Кротова А.Л., Бочарова Д.В.	261
DETECTION OF BETA-LACTAMASE GENES IN KLEBSIELLA PNEUMONIAE ISOLATES ISOLATED AS PART OF VETERINARY MONITORING OF ANTIBIOTIC RESISTANCE Makavchik S.A., Krotova A.L., Bocharova D.V.	261
СОЗДАНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ CD-ДНК-КОНЪЮГАТОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ Филатов П.В., Горбенко Д.А., Дададжанов Д.Р., Ведерникова А.А., Вартамян Т.А.	262
ВАРИАНТЫ КОМБИНИРОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ СРЕДСТВАМ У НЕКОТОРЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ Саперкин Н.В., Широкова И.Ю., Сергеева А.В., Сенина М.Д.	263
РАСПРОСТРАНЕНИЕ КАРБАПЕНЕМ-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ KLEBSIELLA PNEUMONIAE В ОТДЕЛЕНИИ ХИРУРГИИ Билалова А.Б., Лавриненко А.В., Кадырова И.А.	264
СИНЕРГЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ, БАКТЕРИОФАГОВ И ПОЛИСАХАРИД-ДЕПОЛИМЕРАЗЫ НА БИОПЛЕНКИ И ПЛАНКТОННЫЕ КЛЕТКИ KLEBSIELLA PNEUMONIAE Городничев Р.Б., Кривуля А.О., Корниенко М.А., Зайчикова М.В., Малахова М.В., Шитиков Е.А.	265
SYNERGISTIC EFFECTS OF ANTIBIOTICS, BACTERIOPHAGES AND POLYSACCHARIDE DEPOLYMERASE ON BIOFILMS AND PLANKTONIC CELLS OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE Gorodnichev R.B., Krivulya A.O., Kornienko M.A., Zaychikova M.V., Malakhova M.V., Shitikov E.A.	265
ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ M. HUMANIS, ВЫЯВЛЕННЫЕ МЕТОДОМ ПРОТЕОГЕНОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ Галямин А.А., Сикамов К.В., Уразаева Д.Р., Авшалумов А.С., Михайлычева М.В., Бабенко В.В., Смирнов И.П., Побегуц О.В., Горбачев А.Ю.	266
ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ПОЛИМИКСИНАМ (КОЛИСТИНУ) В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ KLEBSIELLA PNEUMONIAE Руденкова Т.В., Костюк С.А., Горбич Ю.Л.	267
ПРЕДСКАЗАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ К АНТИБИОТИКАМ ПО СПЕКТРАМ MALDI TOF ПРИ ПОМОЩИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ Гречишников Д.А.	269
КЛОНАЛЬНЫЙ СОСТАВ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA С ПРОДУКЦИЕЙ МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ С ИНФЕКЦИЕЙ КРОВОТОКА И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ Хрульнова С.А., Фёдорова А.В., Фролова И.Н., Ликольд Е.Б., Молчанова И.В., Ветохина А.В., Куцевалова О.Ю., Клясова Г.А.	270
MOLECULAR CHARACTERISTIC ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN DIARRHEAGENIC ESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM RESIDENTS OF THE REPUBLIC OF GUINEA Balde R., Makarova M. A., Zhamborova M. Kh., Polev D. E., Saitova A. T.	271

ТАРГЕТНОЕ ДНК-СЕКВЕНИРОВАНИЕ РЕДКИХ ВИДОВ ASPERGILLUS SPP Хабибуллин Н.Р., Мальчикова А.О., Хрульнова С.А., Коваль Н.О., Ликольд Е.Б., Клясова Г.А.	272
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУЛЕНТНЫХ ПЛАЗМИД, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ KLEBSIELLA PNEUMONIAE Нурмуқанова В.А., Шаповалова В.В., Мацвай А.Д., Шипулин Г.А.	273
ПЕРВОЕ В РОССИИ СООБЩЕНИЕ О МУТАЦИИ В ГЕНЕ FKS У ЭХИНОКАНДИН РЕЗИСТЕНТНОГО ШТАММА CANDIDA GLABRATA, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ГЕМОКУЛЬТУРЫ: РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЦЕНТРОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ Хабибуллин Н.Р., Мальчикова А.О., Хрульнова С.А., Ликольд Е.Б., Ветохина А.В., Клясова Г.А.	274
ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗИСТОМА ШТАММОВ ACINETOBACTER BAUMANNII, УСТОЙЧИВЫХ К КАРБАПЕНЕМАМ Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Махова М.А., Черневская О.М., Барышева Н.Н.	275
СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗИСТОМА И ВИРУЛОМА ИЗОЛЯТОВ ESCHERICHIA COLI ОТ ХРОНИЧЕСКИ ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ 2-Х НОЗОЛОГИЙ: МУКОВИСЦИДОЗ И ЦИСТИТ. НОВЫЙ ПОДХОД К ЭРАДИКАЦИИ ИНФЕКЦИИ Воронина О.Л., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Рыжова Н.Н., Королева Е.А., Соловьева А.В., Бурмистров Е.М., Амелина Е.Л., Чернуха М.Ю., Зигангирова Н.А.	276
РАЗРАБОТКА ПЦР СИСТЕМ ДЛЯ БЫСТРОГО СКРИНИНГА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ STARHYLOCOCCLUS AUREUS И KLEBSIELLA PNEUMONIAE Корниенко М.А., Беспятых Д.А., Малахова М.В., Городничев Р.Б., Шитиков Е.А.	277
АКТИВАЦИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ОРГАНИЗМА КАК АЛЬТЕРНАТИВА АНТИБИОТИКАМ В БОРЬБЕ С РЕЗИСТЕНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ. УСИЛЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЛИЗОЦИМА В ПРИСУТСТВИИ СВОБОДНЫХ ЗАРЯЖЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ Левашов П.А., Смирнов С.А., Растрига Н.В.	278
РАЗРАБОТКА ТЕСТА НА ОСНОВЕ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК МЕТИЦИЛЛИН-РЕЗИСТЕНТНЫХ СТАФИЛОКОККОВ И ДНК STARHYLOCOCCLUS AUREUS Глуценко Е.Е., Данилова В.С., Савочкина Ю.А., Данилов Д.И., Шипулин Г.А.	279
Раздел 17. КАЧЕСТВО, БЕЗОПАСНОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	
ОЦЕНКА ПОРОГОВЫХ КРИТЕРИЕВ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ, ДОСТАТОЧНЫХ ДЛЯ ОТКАЗА ОТ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ВАЛИДАЦИИ ВАРИАНТОВ Антоненко А.Н., Уланова П.В., Ревкова М.А., Криницына А.А., Беленикин М.С.	281
Раздел 18. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ТРАНСФУЗИОЛОГИИ И ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ	
РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ CES1, PON1 И CER1 В ВЫБОРКЕ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА, ПРИНИМАЮЩИХ ПРОТИВОПРОМБОТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ Кипень В.Н., Зотова О.В., Добыш О.И., Королева Т.С., Бейманов А.Э., Стельмашок В.И., Лемеш В.А.	283
ВЫЯВЛЕНИЕ ВИЧ У ДОНОРОВ КРОВИ В РОССИИ И ЗА РУБЕЖОМ Д.А. Федулenco, О.В. Евсеенко, С.И. Кузнецов, Е.Б. Жибурт	284
СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИММУНОГЕНЕТИКИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧЕК, ВЛИЯНИЕ АНТИ-НLA АНТИТЕЛ Грачева Л. А., Петрова Л. В., Латышева М. Н., Румянцев А. Л.	285
ИССЛЕДОВАНИЕ СТАНОВЛЕНИЯ ДОНОРСКОГО ХИМЕРИЗМА У ДЕТЕЙ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК Морозова Г.А., Шубина Ю.Ф., Бронин Г.О., Бурцев Е.А.	286

SEARCHING THE WAY TO INDIVIDUALIZE INDUCTION IMMUNOSUPPRESSION OF GRAFTED ORGANS Abramov V.	287
STUDY OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF THE INTERLEUKIN 1 BETA GENE IN KIDNEY RECIPIENTS WITH DELAYED GRAFT FUNCTION Abramov V.	287
EXTRA DELAYED GRAFT FUNCTION RISK AFTER TRANSPLANTATION OF ISCHEMIC KIDNEYS RETRIEVED FROM A POSTMORTEM DONOR HOMOZYGOUS FOR THE 4G ALLELE OF THE PAI-1 GENE Abramov V.	288
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ В СЛОЖНЫХ СЛУЧАЯХ ПОСТРАНСФУЗИОННОГО ХИМЕРИЗМА Чумак А.А., Белякова В.В., Майорова О.А., Момотюк К.С., Пухликова Т.В., Рассолова С.В., Личман Ж.С., Хлебникова М.А.	288
АНАЛИЗ ДАННЫХ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ МАРКЕРОВ ГЕМОТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ У ДОНОРОВ КРОВИ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ Г.О. ТОЛЬЯТТИ И Г.О. СЫЗРАНИ ПОСЛЕ ЦЕНТРАЛИЗАЦИИ ТЕСТИРОВАНИЯ Кудинова Е.В., Кузнецов С.И., Киселева Е.В., Суслина О.В., Позднякова Е.А.	289
ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ДОНОР-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕСКЛЕТОЧНОЙ ДНК ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРИЖИВАЕМОСТИ ТРАНСПЛАНТАТА В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ А.И. Шевченко	291
Раздел 19. НОВЕЙШИЕ РАЗРАБОТКИ В ОБЛАСТИ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (NGS)	
РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ ВИДОВОЙ КЛАССИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ УЧАСТКА ГЕНА 16S rRNA Б.С. Гуков, А.Д. Мацвай, Г.А. Шипулин	293
ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ СЛОЖНЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПЛАТФОРМЕ ILLUMINA MISEQ Зятьков А.А., Шафорост А.С., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В.	294
СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБОГАЩЕНИЯ ЭКЗОМА ЧЕЛОВЕКА AGILENT ALL EXON V8 С НАБОРАМИ ОТ КИТАЙСКИХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ VAZUME И NANODIGMВЮ Белова В.А., Поникаровская Н.Г., Шмитко А.О., Самитова А.Ф., Козырева И.В., Репинская Ж.А., Василадис Ю. А., Ребриков Д.В., Коростин Д.О.	295
СЕКВЕНИРОВАНИЕ ЭКЗОМА ЧЕЛОВЕКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРЕДИКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ Готов О.С.	295
ОБЗОР ПРОГРАММНЫХ РЕШЕНИЙ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ АДАПТЕРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И ТРИММИНГА ПРОЧТЕНИЙ ПРИ ОБРАБОТКЕ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ Бобрик П.Ю.	296
АНАЛИЗ ГЕНОМОВ И УСТАНОВЛЕНИЕ ТОКСИГЕННОГО ПРОФИЛЯ БАКТЕРИЙ РОДА BACILLUS Поляков Н.Б., Карпов Д.С., Ковалев М.А., Щербинин Д.Н., Соловьев А.И., Зубашева М.В., Смирнова Т.А., Сухина М.А., Жуховицкий В.Г.	297
КОМПЬЮТЕРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ГЕННОЙ СЕТИ МЕЛАНОМЫ С ПОМОЩЬЮ УТИЛИТЫ SHOWGENE Холодкова Е.И., Волков И.А., Савина Е.А., Орлов Ю.Л.	299

РАЗРАБОТКА МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОЛИГЕННЫХ РИСКОВ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОМА С НИЗКИМ ПОКРЫТИЕМ Апалько С.В., Ностаева А.В., Шиманский В.С., Полковникова И.А., Сушенцева Н.Н., Анисенкова А.Ю., Мосенко С.В., Щербак С.Г.	300
ВОЗМОЖНОСТИ ПЕРСониФИЦИРОВАННОГО МЕДИЦИНСКОГО СОПРОВОЖДЕНИЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ СПОРТСМЕНОВ С УЧЕТОМ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ Жолинский А.В., Кадыкова А.И., Деев Р.В.	301
Раздел 20. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ	
СИСТЕМА ШИРОКОГО СКРИНИГА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (NGS) Д.А. Григорян, И.Ф. Стеценко, А.Д. Мацвай, Г.А. Шипулин	303
АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА НЕЙРАМИНИДАЗЫ ПОДТИПА N9 Копылова Н.В., Дешева Ю.А.	304
ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ MITIS РАЗНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ Афансьева О.М., Грубер И.М., Бржозовская Е.А., Асташкина Е.А.	305
БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ NGS ДЛЯ ОЦЕНКИ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА НА-D222G/N В ВИРУСАХ A(H1N1)pdm09, АССОЦИИРОВАННОГО С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ, В РОССИИ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ СЕЗОНАХ 2018-2023 ГГ. Н.Д. Болдырев, М.Е. Старчевская, Н.П. Колосова, А.В. Даниленко, С.В. Святченко, Г.С. Онхонова, В.Ю. Марченко, А.Б. Рыжиков	307
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗОЛЯТОВ НОРОВИРУСА РЕДКОГО ГЕНОТИПА GII.8[P8], ВЫЗВАВШЕГО ВСПЫШКУ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ Жираковская Е.В., Тикунова Н.В.	309
ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОБЛОТТИНГА В СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА Болотина Е.С., Яковлев И.М., Фомина О.В., Антипин Д.А., Пилипко С.С.	309
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА БАЗЕ БУЗ ВО «ВОКЦПиБС» В ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ В 2020-2022 ГОДАХ Попович Ю.С., Ситник Т.Н., Донская М.А.	311
РАСПРОСТРАНЕНИЕ КАРБАПЕНЕМ-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ PSEUDOMONAS AERUGINOSA В ОТДЕЛЕНИИ РЕАНИМАЦИИ Туремуратова А.Б., Лавриненко А.В., Кадырова И.А.	312
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА VP7(T13) ВИРУСА КЕМЕРОВО ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В ФОРМАТЕ ИФА Куклянова В.В., Стуколова О.А., Карганова Г.Г., Долгова А.С.	313
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ В ЧЕЧЕНСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ Муртазалиев Х.Х., Жамборова М.Х., Макарова М.А.	314
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КОРИ Носова А.О., Богословская Е.В., Цыганова Г.М., Шипулин Г.А.	315
УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ ПАЛЕОБАКТЕРИИ АРХЕОЛОГИЧЕСКИХ ПАМЯТНИКОВ И ПАЛЕОНТОЛОГИЧЕСКИХ МЕСТОНАХОЖДЕНИЙ ЯКУТИИ Гончаров А.Е., Чепрасов М.Ю., Колоджиева В.В., Азаров Д.В., Крыленков В.А., Асланов Б.И.	316

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ КИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ACINETOBACTER BAUMANNII ОТ ПАЦИЕНТОВ СТАЦИОНАРОВ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ Янович О.О., Титов Л.П.	317
ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СЕЗОННЫХ КОРОНАВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2017-2022 ГГ. Мусаева Т.Д., Комиссаров А.Б., Фадеев А.В., Писарева М.М., Едер В.А., Ксенафонтов А.Д., Коржанова М., Иванова А.А., Киселева И.В.	318
РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ СЕМЕЙСТВА ECHO НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ У ШТАММОВ PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ВЫЗЫВАЮЩИХ ТЯЖЕЛЫЕ СЛУЧАИ МУКОВИСЦИДОЗА У ДЕТЕЙ Романова К.А., Садеева З.З., Лазарева А.В., Гейдаров Р.Н., Михайлович В.М.	319
АССОЦИАЦИЯ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ С ОДНОНУКЛЕОТИДНЫМ ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНОВ IFNL3 И IFNL4 У ЛИЦ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ОТ ГРИППА Дедова А.В., Стучинская М.Д., Дедова Л.В., Николаева Л.И., Куприянов В.В., Мукашева Е.А., Крепкая А.С., Краснослободцев К. Г., Трушакова С.В., Бурцева Е.И.	320
IN SILICO АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ГЕНА HLY НА ФОРМИРОВАНИЕ Т-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ ЛИСТЕРИЛИЗИНА O – КАНДИДАТА В СУБЪЕДИНИЧНЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИСТЕРИОЗА Лаврухин М.С., Ogлодина Д.Г., Кичемазова Н.В., Ляпина А.М., Ларионова О.С., Федорова В.А.	320
Раздел 21. ТЕХНОЛОГИИ ВЫЯВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ И НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЧИН ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МОЛОДНЯКА Калашников А.Е., Захаров В.М.	322
ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСОВ ГРИППА ПТИЦ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЧАЕК НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2023 ГОДУ Грехнева А.Д., Андриясов А.В., Зиняков Н.Г., Овчинникова Е.В., Козлов А.А., Никонова З.Б., Гусева Н.А., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.	323
ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ СУБТИПА A/H5N1, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2022 Г. Онхонова Г.С., Косенко М.Н., Егорова М.Л., Васильцова Н.Н., Марченко В.Ю., Рыжиков А.Б.	324
СЛУЧАЙ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА H9N2 В 2023 ГОДУ Осипова О.С., Овчинникова Е.В., Жестков П.Д., Андриясов А.В., Зиняков Н.Г., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.	325
ИЗОЛЯТЫ АДЕНОВИРУСА ПТИЦ, ВЫЯВЛЕННЫЕ НА ПТИЦЕФАБРИКАХ И ЛИЧНЫХ ПОДСОБНЫХ ХОЗЯЙСТВАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2022 И 2023 ГОДАХ Козлов А.А., Зиняков Н.Г., Никонова З.Б., Овчинникова Е.В., Гусева Н.А., Грехнева А.Д., Щербакова Л.О., Волкова М.А., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.	326
ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ У ЛОСЕЙ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ Яцентюк С.П., Красникова М.С., Долинская К.Г., Пчельников А.В.	327
СЛУЧАЙ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА H9N2 Осипова О.С., Овчинникова Е.В., Жестков П.Д., Андриясов А.В., Зиняков Н.Г., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.	329
РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К АДЕНОВИРУСУ ПТИЦ ВИДА В Волкова М.А., Ярославцева П.С., Козлов А.А., Зиняков Н.Г., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.	330
РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТИРОВАНИЙ КОШЕК И СОБАК НА НОСИТЕЛЬСТВО МОНОГЕННЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ПРОВЕДЕННЫХ В ФГБУ «ВГНКИ» ЗА 2018-2022 ГГ. Крылова Е.В., Путинцева А.В., Тимофеева И.А., Кирсанова Н.А., Осипова Ю.А., Солтынская И.В.	331

ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ИЗОЛЯТОВ ОСПЫ ОВЕЦ НА ТЕРРИТОРИИ РФ 2018-2023ГГ. А.О.Кротова, К.А. Шалина, О.П.Бьядовская, И.А.Чвала, А.В.Спрыгин	333
ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ СУБТИПА А/Н5N1, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2022 Г. Онхонова Г.С., Косенко М.Н., Егорова М.Л., Васильцова Н.Н., Марченко В.Ю., Рыжиков А.Б.	334
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА HELICOBACTER У СВИНЕЙ Нургалиев Ф.М., Х.Х. Гильманов	335
АНАЛИЗ ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНОГО УЧАСТКА ГЕНА VP2 ИЗОЛЯТА ДИКОГО ТИПА ВИРУСА БОЛЕЗНИ ГАМБОРО Толькова Е.С., Шепелева О.А.	336
ОСОБЕННОСТИ СПЕКТРА АЛЛЕЛЕЙ С ВЫСОКОЙ ЧАСТОТОЙ ГЕНА DRB3 У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА Лазебная И.В., Лазебный О.Е.	337
ПДРО-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ ПСЕВДОМОНАД, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ Терлецкий В.П., Овчарова Е.С.	338
ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОМА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Мазлум Али	339
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОПЛАЗМЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ Козлова А.Д., Горбачева Н.С., Красникова М.С., Брюсова М.Б., Яцентюк С.П.	341
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ СТАДА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, СВОБОДНОГО ОТ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КОРОВ Д.А. Бабошко, К.А. Елфимов, А.И. Кузьмин, О.А. Рожков, А.В. Тотменин, М.В. Флеер, Н.М. Гашникова	342
РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ Морозова Е.О., Садчикова А.С., Шотин А.Р., Иголкин А.С., Мазлум Али	343
ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОМОТОРОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ Рудакова С.В., Кольцов А.Ю., Сухер М.М., Кольцова Г.С., Холод Н.С.	344
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ВЕТЕРИНАРИИ Тыщенко В.И., Овчарова Е.С.	345
РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ Садчикова А.С., Иголкин А.С., Мазлум А.	347
SNP-БИОЧИП ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАПЛОТИПОВ АССОЦИИРОВАННЫХ С МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ БЫКОВ И МЕРТВОРЖДЕНИЕМ КРУПНО-РОГАТОГО СКОТА ПОРОДЫ АБЕРДИН-АНГУС Кочкин Р.О., Марзанова С.Н., Николаева М.А.	348
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЛЯ БЫСТРОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ Титов И.А., Нефедьева М.В., Колбасов Д.В.	349
ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ В ФОРМАТЕ ИММУНОЧИПА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ВАКЦИНАЦИИ В ПТИЦЕВОДСТВЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИДКОЙ СЫВОРОТКИ И СУХОЙ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ Саушкин Н.Ю., Самсонова Ж.В., Осипов А.П., Преснова Г.В., Рубцова М.Ю.	350

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ СВИНЕЙ В ХОЗЯЙСТВАХ РФ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-РВ М.В. Тиманов, А.М. Тимина, М.В. Бирюченкова	352
ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОДИАГНОСТИЧЕСКОГО АЛГОРИТМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ПРОВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ ПРИ ЛЕЙКОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА Козырева Н.Г., Абашин И.Ю., Степанова Т.В.	352
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ КЛОСТРИДИЙ ВИДОВ <i>C. SPOROGENES</i>, <i>C. PERFRINGENS</i> И <i>C. SORDELLII</i> Нефедченко А.В., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Судоргина Т.Е., Котенева С.В.	354
УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СТРАТЕГИИ ПЦР-ПДРФ-ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИРУСА БЫЧЬЕГО ЛЕЙКОЗА Гильманов Х.Х., Вафин Р.Р.	355
РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПЦР С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ С ЦЕЛЬЮ АМПЛИФИКАЦИИ МАРКЕРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОМА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ Чернышев Р.С., Сидоренкова М.С., Садчикова А.С., Иголкин А.С., Мазлум А.	356
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА А СУБТИПА H5 У ПТИЦ, В ТОМ ЧИСЛЕ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА А ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КЛАДЫ 2.3.4.4b Шуряева А.К., Давыдова Е.Е., Толоконцева А.А., Полякова В.А., Лупарев А.Р., Девятов А.А., Шипулин Г.А.	358
РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПЦР С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ С ЦЕЛЬЮ АМПЛИФИКАЦИИ МАРКЕРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОМА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ Чернышев Р.С., Сидоренкова М.С., Садчикова А.С., Иголкин А.С., Мазлум А.	359
ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ МОЛОКА КОРОВ БОЛЬНЫХ МАСТИТОМ МЕТОДОМ NGS Буракова И.Ю., Смирнова Ю.Д., Грязнова М.В., Морозова П.Д., Сыромятников М.Ю.	361
MOLECULAR EVIDENCE OF <i>BAVESIA OVATA</i> IN CATTLE IN RUSSIA Alexeenkova S.V., Zhuravleva E. A., Malceva O. E., Loschinin M. N.	362
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСТОПОРОДНОСТИ НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА SNP ДЛЯ СВИНЕЙ ПОРОДЫ БЕЛОРУССКАЯ КРУПНАЯ БЕЛАЯ Снытков Е.В., Кипень В.Н., Михайлова М.Е., Шейко Р.И.	362
ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ SNP ДЛЯ СВИНЕЙ ПОРОДЫ БЕЛОРУССКАЯ МЯСНАЯ Снытков Е.В., Кипень В.Н., Михайлова М.Е., Шейко Р.И.	364
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛОШАДЕЙ БЕЛОРУССКОЙ УПРЯЖНОЙ ПОРОДЫ, РАЗВОДИМОЙ НА ПЛЕМЕННОМ КОННОМ ЗАВОДЕ «ЖОДИНОАГРО-ПЛЕМЭЛИТА» Долматович Т.В., Сазанович Н.С., Шейко Р.И.	365
РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ВЭЖХ-МС/МС МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ЛИДОКАИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТА 2,6-ДИМЕТИЛАНИЛИНА В ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ Гончарова Е.Н., Комаров А.А., Габидуллина Д.Э.	366
ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОСПЫ ВЕРБЛЮДОВ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА Сейсенбаева М.С., Кошеметов Ж.К., Оразымбетова Н.К., Умуралиев Б.К.	367
DIAGNOSTIC DRUG FOR THE DIAGNOSIS OF CAMEL POX USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY Seisenbayeva M.S., Koshemetov Zh.K., Orazymbetova N.K., Umuraliev B.K.	368

Раздел 22. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК СОИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОЕВЫХ АЛЛЕРГЕНОВ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ Петецкая В.Н., Минаев М.Ю., Хвостов Д.В.	370
РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО РИСА МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» Акинина Т.Н., Осипова Ю.А., Солтынская И.В., Крылова Е.В., Вострикова О.В.	371
КАЧЕСТВЕННОЕ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ТИЛЯПИЙ В ОДНОКОМПОНЕНТНОЙ РЫБНОЙ ПРОДУКЦИИ Козлова А.Д., Красникова М.С., Горбачева Н.С., Брюсова М.Б., Долинская К.Г., Яцентюк С.П.	372
ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК КУР МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ В СТЕРИЛИЗОВАННЫХ КОНСЕРВАХ И РАСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА МЯСНОГО ИНГРЕДИЕНТА КУР Минаев М.Ю., Фомина Т.А.	373
ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА <i>Aspergillus oryzae</i> RCAM 01134 В ПРОИЗВОДСТВЕ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОСНОВЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЕНОМНОГО АНАЛИЗА Гурэу З.Г., Багрянцева О.В.	375
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВА ОБРАЗЦОВ КОФЕ В АСПЕКТЕ СООТВЕТСТВИЯ СОДЕРЖАНИЯ КОФЕИНА ЗАЯВЛЕННОМУ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ Кузьменко Л.В., Шанский Я.Д., Беспятых Ю.А.	376
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И ПРОДУКЦИИ АЛЬТЕРНАРИАТОКСИНОВ МИКРОМИЦЕТАМИ РОДА ALTERNARIA ИЗ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ ПРИ АНАЛИЗЕ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МЕТОДАМИ Минаева Л.П., Маркова Ю.М., Седова И.Б., Чалый З.А.	378
POLYMORPHISM AX-116347327 — HIGH DIFFERENTIATION ABILITY TO DIFFERENTIATE BIOLOGICAL SAMPLES BELONGING TO SUS SCROFA SCROFA OR SUS SCROFA DOMESTICUS Kipen V.N., Patrin M.M.	379
РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БАКТЕРИЙ ВИДА SALMONELLA ENTERICA Сулдына Е.В., Феоктистова Н.А., Ломакин А.А., Мاستиленко А.В., Богданов И.И.	380
РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДИК ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ДНК ЖИВОТНЫХ В МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ Солтынская И.В., Богомазова А.Н., Крылова Е.В., Кирсанова Н.А., Тимофеева И.А., Путинцева А.В., Зайцева Е.В., Гергель М.А.	381
РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ AQUADVANTAGE SALMON Путинцева А.В., Кирсанова Н.А., Богомазова А.Н., Крылова Е.В., Солтынская И.В., Гергель М.А.	383
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВА ОБРАЗЦОВ КОФЕ В АСПЕКТЕ СООТВЕТСТВИЯ СОДЕРЖАНИЯ КОФЕИНА ЗАЯВЛЕННОМУ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ Кузьменко Л.В., Шанский Я.Д., Беспятых Ю.А.	384
ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДОВ BOS TAURUS И BOS GRUNNIENS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SNP – БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ Кипень В.Н., Исакова Ж.Т.	385
ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕКЛОФЕНОКСАТА МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ НА МОДЕЛИ КОРОТКОЖИВУЩИХ РЫБ N. GUENTHERI Бахтогаримов И.Р.	387

SNP DIFFERENTIATION POTENTIAL FOR YORKSHIRE PIGS Snytkov E.V., Kipen V.N., Mikhailova M.E., Sheyko R.I.	388
---	-----

Раздел 23. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ

ГИДРОФОБИНЫ И ГЛУТАРЕДОКСИНЫ АСПЕРГИЛЛОВ, КАК МАРКЕРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ, ДОСТУПНЫЕ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОБНАРУЖЕНИЯ Рябинин И.А., Васильева Н.В.	390
--	-----

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НЕЙРОИНФЕКЦИЙ ПРИ ПОРАЖЕНИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ Шахгильдян В.И., Домонова Э.А., Ядрихинская М.С., Орловский А.А., Канестри В.Г., Тишкевич О.А., Яровая Е.Б.	391
--	-----

Раздел 24. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ВОСПРОИЗВОДСТВЕ И ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ В СЕЛЬСКОМ И ЛЕСНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАРКЕРОВ ДНК В ОТСЛЕЖИВАНИИ ПУТЕЙ РАСПРОСТРАНЕНИЯ В РОССИИ ИНВАЗИЙНОЙ ГРУППИРОВКИ УССУРИЙСКИЙ ПОЛИГРАФ – ФИТОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ Баранчиков Ю.Н., Кононов А.В., Ефременко А.А., Перцовая А.А., Пашенова Н.В.	393
---	-----

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИКОНТАМИНАЦИОННОЙ ПЦР В КАРАНТИННОЙ ДИАГНОСТИКЕ Дренова Н. В., Яремко А.Б., Кондратьев М.О.	394
---	-----

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ FUSARIUM SAMBUSINUM, ИНДУЦИРУЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ ПШЕНИЦЫ И ТОМАТА К ФУЗАРИОЗАМ, С ПОМОЩЬЮ ТРАНСКРИПТОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ И ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ Щербакова Л.А., Одинцова Т.И., Слезина М.П., Истомина Е.А.	395
--	-----

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА В МОНИТОРИНГЕ ИНВАЗИВНЫХ ФИТОПАТОГЕНОВ Звягинцев В.Б., Иващенко Л.О.	396
---	-----

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-БАРКОДИНГА ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ НАХОДКИ СОСНОВОГО ПОХОДНОГО ШЕЛКОПРЯДА ТНАУМЕТОРОЕА РИТУОСАМПА (LEPIDOPTERA: NOTODONTIDAE) НА ЧЕРНОМОРСКОМ ПОБЕРЕЖЬЕ РОССИИ Карпун Н.Н., Гомбоц С., Кириченко Н.И.	398
---	-----

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ VIDENS PILOSA L. (MAGNOLIOPHYTA, ASTERACEAE) Кулаков В.Г., Кулакова Ю.Ю., Володина Е.А., Вишняков К.Н.	399
--	-----

ИДЕНТИФИКАЦИЯ PSEUDOMONAS FUSCOVAGINAE МОЛЕКУЛЯРНЫМИ И КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ Десятерик А.А., Словарева О.Ю.	400
--	-----

ДИАГНОСТИКА ФИТОПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР МЕТОДОМ ИФА Ахба Е. Д., Павлов К. В.	401
---	-----

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОГО ПРОТОКОЛА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР Спивак В. В., Янковская А. А., Капитова И. А.	402
--	-----

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ КАРАНТИННЫХ ВИРУСОВ КАРТОФЕЛЯ Приходько Ю.Н., Шнейдер Ю.А., Живаева Т.С., Кондратьев М.О., Лозовая Е.Н., Каримова Е.В., Башкирова И.Г.	403
---	-----

ПРИМЕНЕНИЕ НОВОГО ТЕСТА ПЦР В «РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧЕРНОГО БАКТЕРИОЗА ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР XANTHOMONAS TRANSLUCENS Словарева О.Ю., Яремко А.Б., Кашина Ю.Г., Селявкин С.Н., Дренова Н.В.	404
РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ КРИНИВИРУСОВ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИХ ПОТЕНЦИАЛЬНУЮ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОВОЩЕВОДСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ Лозовая Е.Н., Живаева Т.С., Приходько Ю.Н.	405
РАЗРАБОТКА НОВОГО ПЦР-ТЕСТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛИСТОВОГО ОЖОГА ЛУКА <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i> Каракай М.В., Приходько С.И., Яремко А.Б.	406
РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ FUSARIUM OXYSPORUM ДЛЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» Чекалин А.М., Феоктистова Н.А., Мастиленко А.В., Богданов И.И., Ломакин А.А, Сульдина Е.В., Тойгильдин А.Л.	407
ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ ФИТОПЛАЗМ, ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ В РОССИИ, ОПРЕДЕЛЕННАЯ НА ОСНОВАНИИ ГЕНА 16S rRNA Кастальева Т.Б., Гирсова Н.В., Богоутдинов Д.З.	408
ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СОЕВОЙ ЦИСТООБРАЗУЮЩЕЙ НЕМАТОДЫ HETERODERA GLYCINES Иванов А.В., Бондаренко Г.Н.	410
ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ (FRAGARIA ANANASSA) С ЦЕЛЬЮ СОРТОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ Тарасова Е.В.	411
ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ И МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНОЙ СТРУКТУРЫ ФИТОПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ ВИНОГРАДА НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ Бондаренко Г.Н., Мурашова Е.К.	412
БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА МОРДОВНИКА ШАРОГОЛОВОГО ПО ОТНОШЕНИЮ К ВОЗБУДИТЕЛЮ БУРОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ГНИЛИ Доморацкая Д.А., Раменскова М.В.	413
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПШЕНИЦЫ Гирсова Н.В., Кастальева Т.Б., Аблова И.Б., Беспалова Л.А., Джавахия В.Г.	414
ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ СЕЛЕКЦИИ ФГБНУ ФНЦ САДОВОДСТВА ДЛЯ ПАСПОРТИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ Гузеева А.А., Капитова И.А.	415
ENHANCING DETECTION AND IDENTIFICATION METHODS OF CURTOBACTERIUM FLACCUMFACIENS PV. FLACCUMFACIENS ((HEDGES) COLLINS & JONES) ON SOYBEAN PLANTS AND SEEDS Ignatyeva I.M., Prikhodko S.I., Domoratskaya D.A.	416
THE PCR TEST OPTIMIZATION AS AN ADDITIONAL METHOD OF IDENTIFYING THE BACTERIAL BLIGHT OF PEA PATHOGEN Ignatieva I.M., Bakaeva A.S., Prikhodko S.I.	417
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРОГА МЕЖДУ ВНУТРИВИДОВОЙ И МЕЖВИДОВОЙ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЧИВОСТЯМИ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ФИТОСАНИТАРНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАСЕКОМЫХ И КЛЕЩЕЙ МЕТОДОМ ДНК-БАРКОДИНГА Камаев И.О., Шипулин А.В.	418
БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХЛОРОПЛАСТНЫХ МАРКЕРОВ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА PISEA В КРИМИНАЛИСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ Верчук А.Н.	419

ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВОГО ЧУЖЕРОДНОГО ВИДА МИНИРУЮЩЕЙ МОЛИ CHRYSASTER OSTENSACKENELLA (LEPIDOPTERA: GRACILLARIIDAE) НА РОБИНИИ ЛОЖНООКАЦИЕВОЙ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ Кириченко Н.И., Коляда Н.А., Гомбоц С.	421
Раздел 25. НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	
КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ У БЕРЕМЕННЫХ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ Боровкова Л.В., Колобова С.О., Андосова Л.Д., Шахова К.А., Тихомирова Ю.Р., Дмитриева А.А.	423
РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ РНК-СОДЕРЖАЩЕГО ВИРУСА HENDRA НА ОСНОВЕ ДЕЗОКСИРИБОЗИМОВ А.Д. Кириченко, Е.А. Брюшкова, А.С. Долгова, В.Г. Дедков	424
ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРИЧИН РАННЕЙ ЭМБРИОЛЕТАЛЬНОСТИ И НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ Лебедев И.Н., Никитина Т.В.	425
CD68 КАК ИММУННЫЙ БИОМАРКЕР ГРАНУЛЕМАТОЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ Лыкова К.О., Зубарева Т.С.	426
МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОРНК С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИМЕРИЗАЦИИ Сахавутдинова А.Р., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В., Гарафутдинов Р.Р.	427
ГИДРОГЕЛЕВЫЕ БИОЧИПЫ – ИНСТРУМЕНТЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ БИОМАРКЕРОВ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ Грядун Д.А., Иконникова А.Ю., Дементьева Е.И., Поляков С.А., Филиппова М.А., Савватеева Е.Н., Антонова О.В., Кулагина Е.В., Емельянова М.А., Кандинов И.Д., Кравцов Д.В., Шаскольский Б.Л., Зименков Д.В., Чудинов А.В., Заседателев А.С.	429
ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ СОВМЕСТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОРНК MIR-155, MIR-15A И МРНК ROR1 ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ Столяр М.А., Галанин В.В., Горбенко А.С., Бахтина В.И., Ольховский И.А.	430
РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА HENDRA НА ОСНОВЕ CAS12A/RPA Капитонова М.А., Шабалина А.В., Дедков В.Г., Долгова А.С.	431
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ β-АМИЛОИДНЫХ ПРИОННЫХ СТРУКТУР В ТКАНИ ЦНС ПРИ БОЛЕЗНИ ГЕРСТМАННА-ШТРЕУССЛЕРА-ШЕЙНКЕРА Асташонок А.Н., Полещук Н.Н.	432
РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДЕТЕКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ОСНОВЕ 4WJ ДНК-СЕНСОРОВ И АГРЕГАЦИИ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ Березовская М.Ю., Брюккель А.Г., Быковская М.А., Горбенко Д.А.	433
РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ АНАЛИТОВ ДВУХЦЕПОЧНОЙ ДНК ПРИ 37°C Бушаев А.А., Атие М., Рубель М.С., Колпашиков Д.М.	433
КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК КАК МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР СЕНЕСЦЕНЦИИ Зятыков А.А.	434
ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА ЛЕЙКОЦИТОВ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ КАРДИО-ВАСКУЛЯРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ Плехова Н.Г., Черненко И.Н., Невзорова В.А., Семенова П.А.	435
РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА ДЛЯ АБСОЛЮТНОЙ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ УНИКАЛЬНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ РЕПЕРТУАРОВ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА С ПОМОЩЬЮ ЦИФРОВОЙ ПЦР Слепцов А.А., Назаренко М.С.	436

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ДОЗАЗАВИСИМЫМ ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ Ачкасова М.А., Шкоденко Л.А.	437
ОПОСРЕДОВАННАЯ ШПИЛЬКОЙ, НЕЗАВИСИМАЯ ОТ ПРАЙМЕРОВ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ (NAIR), КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕТОД ДНК-ДИАГНОСТИКИ Набережнов Д.С.	438
МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ БЕЛКИ ТОМ-КОМПЛЕКСА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ СТАРЕНИЯ И ГЕРОПРОТЕКТОРНОЙ ТЕРАПИИ Зубарева А.С., Зубарева Т.С.	439
СОЧЕТАНИЕ МЕТОДА К-БЛИЖАЙШИХ СОСЕДЕЙ И МЕТОДА ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ И СКРИНИНГА БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ Р.В. Бутяев, Л.В. Плотникова, А.М. Поляничко	440
ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-κB ПРИ ЕСТЕСТВЕННОМ СТАРЕНИИ, СОПРОВОЖДАЮЩИМСЯ ХРОНИЧЕСКИМ ВОСПАЛЕНИЕМ (ИНФЛАМЕЙДЖИНГОМ) Белова Ю.И., Зубарева Т.С.	441
ИССЛЕДОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ МИКРО РНК MIR-16, MIR-21, MIR-221 И MIR-222 ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ Тимерман А.Д., Столяр М.А., Галанин В.В., Горбенко А.С., Ольховик Т.И., Здзярская О.Л., Гаранджук А.И., Бахтина В.И., Ольховский И.А.	442
Раздел 26. SARS-CoV-2	
ИДИОПАТИЧЕСКИЙ ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ И COVID-19-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЛЕГОЧНЫЙ ФИБРОЗ: РОЛЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В МОЛЕКУЛЯРНОМ ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ Зулкарнеев Ш.Р., Корытина Г.Ф., Маркелов В.А., Гибадуллин И.А., Зулкарнеев Р.Х., Авзалетдинов А.М., Загидуллин Н.Ш.	443
ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ACE И ACE2 НА ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ COVID-19. МЕТААНАЛИЗ Гореленко М.В., Аль-Джавади А.М.А., Алсет Д.М., Ид М., Покудина И.О.	444
АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ OMICRON И DELTA SARS-COV-2 СРЕДИ БОЛЬНЫХ, ПОСТУПАЮЩИХ В ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ СТАЦИОНАР Шевякова Е.А., Зыкова Т.А.	445
ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМНОГО И МУКОЗАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ПОСТКОВИДНОМ СИНДРОМЕ, АССОЦИИРОВАННОМ С РЕКУРЕНТНЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ Агафонова Е.В., Решетникова И.Д., Петрова Д.Н.	446
ОСОБЕННОСТИ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА IL-6 C-174G У ДЕТЕЙ С COVID-19 Агеева Е.С., Аблаева Р.Н., Рымаренко Н.В., Дядюра Е.Н.	447
ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЁСШИХ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ Куликова Д.Б., Носова В.О., Плотников А.А., Вечканов Е.М.	448
АССОЦИАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ SOD1 И SOD2 С ТЯЖЕСТЬЮ ТЕЧЕНИЯ COVID-19 Ид М., Шкурят Т.П.	449
ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ С ТЯЖЕСТЬЮ ТЕЧЕНИЯ COVID-2019 Аль-Джавади А.М.А., Покудина И.О., Гутникова Л.В., Александрова А.А., Шкурят Т.П.	450
РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТОВ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ К СПАЙКОВОМУ БЕЛКУ SARS-COV-2 НА ОСНОВЕ E.COLI Арипов В.С., Волкова Н.В., Наякшин А.М., Мечетина Л.В., Чикаев Н.А., Несмеянова В.С., Исаева А.А., Ильичев А.А., Таранин А.В., Щербиков Д.Н.	450

КОМБИНАЦИИ ГЕНОТИПОВ TLR9 T-1237C – IL6 G-174C У БОЛЬНЫХ COVID-19 РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ С. Э. Баландина, С. В. Беляева, Д. С. Сташкевич, Т. А. Сулова, А. А. Крохин	451
ПОЛУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К НУКЛЕОКАПСИДНОМУ БЕЛКУ ВИРУСА SARS CoV-2 Порываева В.А., Могильных А.К., Малыгина М.А., Агафонова О.А., Усикова Л.А., Некрасов Б.Г., Репникова Е.Г., Хвостова Е.П., Бабкина И.Н., Брежнева С.О., Вторушина И.А., Рукавишников М.Ю.	453
НЕЛИНЕЙНАЯ ВЗАИМОЗАВИСИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЯ УРОВНЕЙ АНТИ-SARS-COV-2 IGG С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМ АБВОТТ И EUROIMMUN Иванов А.В., Уварова М.А., Семенова Е.В.	454
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ COVID-19 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ШТАММА ВОЗБУДИТЕЛЯ Санькова М.В., Полуэктова В.Б.	455
ВАРИАНТЫ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К SARS-COV-2 У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ ВРЕМЕННОГО ИНФЕКЦИОННОГО ГОСПИТАЛЯ Решетникова И.Д., Агафонова Е.В., Хакимов Н.М., Тюрин Ю.А., Шайхразиева Н.Д.	456
VARIANTS OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO SARS-COV-2 IN MEDICAL WORKERS OF A TEMPORARY INFECTION HOSPITAL Reshetnikova I.D., Agafonova E.V., Khakimov N.M., Tyurin Yu.A., Shaykhrazieva N.D.	456
РЕЗУЛЬТАТЫ ВАЛИДАЦИИ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ RT-LAMP В КАЧЕСТВЕ МЕТОДА ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ SARS COV-2 Дё К.Г., Касимов А.Э., Херай Т.Р.	457
АНАЛИЗ УРОВНЕЙ МОЛЕКУЛ TREC И KREC В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ COVID-19 С ЛЕТАЛЬНЫМ ИСХОДОМ Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В.	458
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА rs2066845 ГЕНА NOD2 У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕГКОЙ И ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ ТЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ COVID-19 Рогачева А.В., Александрова А.А., Гутникова Л.В.	459
ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ COVID-19 Иванова Е.С., Прокофьев В. Н.	460
ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ПОСТКОРОНАВИРУСНОМ СИНДРОМЕ Носова В.О., Вечканов Е.М., Плотников А.А.	460
НОВАЯ КОРОНАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ В ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ Старкова О.Г., Тихомиров Д.С., Овчинникова Е.Н., Мисько О.Н., Солдатова Т.А., Крылова А.Ю., Туполева Т.А., Гапонова Т.В.	461
ДИНАМИКА ВЫЯВЛЕНИЯ ШТАММОВ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2 В УРАЛЬСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ В 2021-2023 ГГ. Озерова А.Н., Бакштановская И.В., Степанова Т.Ф.	462
ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА ИММУНОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Кадырова Р.А., Вакин В.С., Грудинин М.П., Лиознов Д.А.	464
ДНК-ВАКЦИНА ПРОТИВ COVID-19, КОДИРУЮЩАЯ ПОЛИЭПИТОПНЫЙ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНОГЕН Боргоякова М.Б., Рудомётов А.П., Старостина Е.В., Задорожный А.М., Кисакова Л.А., Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Пьянков О.В., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А.	465
ВЛИЯНИЕ ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2 НА ПАТОЛОГИЮ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Хабаров О.Р., Зима Д.В., Безруков О.Ф., Зяблицкая Е.Ю.	466

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО S-БЕЛКА SARS-COV-2 НА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕК293Т ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	
Косенко М.Н., Онхонова Г.С., Иматдинов А.Р., Прудникова Е.Ю., Иматдинов И.Р., Сулопаров И.М., Рыжиков А.Б.	467
ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА (CRP) И ИНДЕКСОВ ВОСПАЛЕНИЯ, ЗАВИСЯЩИХ ОТ ЗНАЧЕНИЯ CRP, У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19	
Хаджиева М.Б., Грачева А.С., Кузовлев А.Н.	468
СОБЫТИЯ РЕКОМБИНАЦИИ И КО-ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2, ВЫЯВЛЕННЫЕ В РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТАХ В 2020-2022 ГГ.	
Черняева Е. Н., Айгинин А.А., Косенков А. В., Романова С.В., Цыпкина А.В., Лупарев А.Р., Стеценко И.Ф., Гнусарева Н.И., Мацвай А.Д., Савочкина Ю.А., Шипулин Г.А.	469
ДИНАМИКА СОСТАВА МИКРОБИОМА ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 И «ПРИНЦИП АННЫ КАРЕНИНОЙ»: ВСЕ ЛИ МИКРОБНЫЕ «СЕМЬИ НЕСЧАСТНЫ ПО-СВОЕМУ»?	
Игнатъева О.А., Гостев В.В., Тараскина А.Н., Цветкова И.А., Павлова П.А., Сулян О.С., Агеевец В.А., Лихолетова Д.В., Чулкова П.С., Никитина Е.В., Маткава Л.Р., Терехов М.В., Лисовая Д.Д., Каштанова Д.А., Иванов М.В., Калиногорская О.С., Авдеева А.А., Жирков А.А., Голева О.В., Захаренко С.М., Жданов К.В., Стрижелецкий В.В., Гомон Ю.М., Круглов А.Н., Ни О.Г., Носкова Т.В., Горбова И.В., Черенкова Г.Ю., Шлык И.В., Афанасьев А.А., Юдин В.С., Макаров В.В., Сидоренко С.В., Юдин С.М.	470
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ТЯЖЕЛОМУ ТЕЧЕНИЮ COVID-19: ОТ ГЕНОВ К БЕЛКУ ЧЕРЕЗ МОДЕЛИРОВАНИЕ IN SILICO	
Гусакова М.С., Иванов М.В., Каштанова Д.А., Тараскина А.Н., Ерема В.В., Микова В.М., Лошкарев Р.И., Игнатъева О.А., Акинъшина А.И., Митрофанов С.И., Снигирь Е.А., Юдин В.С., Макаров В.В., Кескинов А.А., Юдин С.М.	471
ЭПИТРАНСКРИПТОМНЫЕ МОДИФИКАЦИИ В РАЗВИТИИ ВИРУСНОЙ ПЕРСИСТЕНЦИИ	
Балан О.В., Панова Э.В., Кирьянова К.А., Таева У.Е., Тихонович Э.Л., Шошина Е.А.	472
Раздел 27. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В НЕВРОЛОГИИ	
ГЕНЕТИЧЕСКОЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА	
Шевчук Д. В., Захарова М. Н., Абрамычева Н. Ю., Проценко А. Р.	474
ГЕНЕТИКА ПЕРВИЧНЫХ ДИСТОНИЙ	
Протопопова А.О., Абрамычева Н.Ю., Ключников С.А., Шпилюкова Ю.А., Краснов М.Ю., Евдокимов К.М., Иллариошкин С.Н.	475
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ КОГНИТИВНОГО СТАТУСА: НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ	
Каштанова Д.А., Мамчур А.А., Джуманиязова И.Х., Иванов М.В., Ерема В.В., Зеленова Е.А., Яковчик А.Ю., Гусакова М.С., Румянцева А.М., Терехов М.В., Маткава Л.Р., Акопян А.А., Стражеско И.Д., Юдин В.С., Макаров В.В., Краевой С.А., Ткачева О.Н., Юдин С.М.	476
Раздел 28. ДРУГОЕ	
АКТИВНОСТЬ АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНА В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ БИОМАРКЕР ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА	
Павленко Т.А., Чеснокова Н.Б., Нодель М.Р., Безнос О.В., Угрюмов М.В.	478
ЧАСТЬ 2. СООТНОШЕНИЕ КЕТОКИСЛОТ α-КЕТОГЛУТАРАТА И α-КЕТОГЛУТАРАМАТА ОТРАЖАЕТ СТЕПЕНЬ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИИ	
Шурубор Е.И., Кескинов А.А., Юдин В.С., Красников Б.Ф.	479
PART 2. RATIO OF KETOACIDS α-KETOGLUTARATE AND α-KETOGLUTARAMATE REFLECTS THE DEGREE OF DEVELOPMENT OF CHRONIC HEPATOENCEPHALOPATHY	
Shurubor E.I., Keskinov A.A., Yudin V.S., Krasnikov B.F.	481

ЭКСПРЕССИЯ NF-κB1/RELA В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С ЛЕГКОЙ И ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА Алексеева А.С., Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова А.Л.	482
ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ: ПРОБЛЕМА ПОДБОРА ДОНОРОВ И ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ Беспятых Ю.А., Серёгин Г.З., Шанский Я.Д., Комарова А.В., Кузьменко Л.В., Олехнович Е.И., Климина К.М., Жгун Е.С., Прохорова Н.Д., Бронин Г.О., Господарик А.В.	483
ОЦЕНКА КЛИНИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ КОРРЕЛЯЦИЙ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН-ЗАВИСИМЫХ АНТИОКСИДАНТОВ С УРОВНЕМ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ДЕПРЕССИВНЫМ СИНДРОМОМ Васильева Е.Ф., Савушкина О. К., Прохорова Т.А., Терешкина Е.Б.	484
ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К TREPONEMA PALLIDUM: ОПТИМИЗАЦИЯ ПОСТНАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ИССЛЕДОВАНИЯ Фомина О.В., Болотина Е.В.	486
ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ КОМПОНЕНТА СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА C1Q В ДИАГНОСТИКЕ РЕЦИДИВИРУЮЩИХ АНГИООТЕКОВ Гурьянова И.Е., Любушкин А.В., Белько Е.А., Вертелко В.Р., Жаранкова Ю.С., Алешкевич С.Н., Полякова Е.А., Белевцев М.В.	487
ПОВЫШЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ АМПЛИФИКАЦИИ УЧАСТКА ГЕНА SMN1 С ПОМОЩЬЮ ВКЛЮЧЕНИЯ ЗАБЛОКИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ (LNA) В ПРАЙМЕР Ермаченко Е.Д., Романов А.С., Лисок А.В.	488
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ СТАРЕНИЯ И ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ Копенкин М.А., Базарный В.В., Полушина Л.Г., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В.	489
ЧАСТЬ 1. МЕТАБОЛОМНЫЙ ПАТТЕРН КРОВИ И ТКАНЕЙ ОРГАНОВ КРЫС ПОСЛЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОТ ПЕРЕНЕСЕННОЙ ОСТРОЙ ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИИ УКАЗЫВАЕТ НА СОХРАНЕННИЕ ОСТАТОЧНОГО ДИСБАЛАНСА МЕТАБОЛИТОВ Шурубор Е.И., Кескинов А.А., Юдин В.С., Красников Б.Ф.	490
PART 1. METABOLOMIC PATTERN OF BLOOD AND TISSUES OF RAT ORGANS AFTER RECOVERY FROM ACUTE HEPATOENCEPHALOPATHY INDICATES ON PRESERVATION OF RESIDUAL METABOLITE IMBALANCE Shurubor E.I., Keskinov A.A., Yudin V.S., Krasnikov B.F.	491
ВЛИЯНИЕ РЕПЛИКАТИВНОГО И ИНДУЦИРОВАННОГО СТАРЕНИЯ НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА Савицкий Д.В., Линькова Н.С., Козлов К.Л., Кветная Т.В.	492
ДЛИТЕЛЬНАЯ АЛКОГОЛИЗАЦИЯ КРЫС РОДА W1STAR ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ УРОВНЯ мРНК IL13 И TGFbeta В РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА Игнатова П.Д., Ереско С.О., Айрапетов М.И.	493
ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ – ОСНОВА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА ПРИ СКРИНИНГЕ НА ВРОЖДЕННЫЕ БОЛЕЗНИ МЕТАБОЛИЗМА У ДЕТЕЙ Мамедов И.С.	494
ВЛИЯНИЕ АЗИТРОМИЦИНА НА СОСТОЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СИСТЕМЫ TLR4-СИГНАЛИЗАЦИИ В ПРИЛЕЖАЮЩЕМ ЯДРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ОТМЕНЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ Матвеев Н.М., Шукина А.А., Ереско С.О., Айрапетов М.И., Игнатова П.Д., Михайлова А.А., Ганьшина Д.А., Суханова Д.Д., Косякова Г.П., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д.	495
КОСВЕННОЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗЛОУПОТРЕБЛЕНИЯ СОЛЯМИ КОБАЛЬТА И ИНЕРТНЫМ ГАЗОМ КСЕНОНОМ ПО ЦИРКУЛИРУЮЩИМ МИКРОРНК КРОВИ В ЦЕЛЯХ ДОПИНГ-КОНТРОЛЯ Пронина И.В., Мочалова Е.С., Постников П.В.	496

ПРИМЕНЕНИЕ ДАННЫХ ОБ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТАРНЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ПРЕДИКЦИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ С ПОЗДНО МАНИФЕСТИРУЮЩИМИ РАССТРОЙСТВАМИ ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА Савушкина О.К., Бокша И.С., Шешенин В.С., Почуева В.В., Прохоров Т.А, Терешкина Е.Б., Воробьева Е.А., Бурбаева Г.Ш.	497
СОПОСТАВЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА МЕТОДАМИ 16S NGS И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР-РВ Злобовская О.А., Дементьева Е.В., Курносов А.С., Глазунова Е.В., Макаров В.В., Шипулин Г.А.	498
ЧАСТЬ 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ α-КЕТОГЛУТАРАТА И α-КЕТОГЛУТАРАМАТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И В ОРГАНАХ КРЫС В РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИИ Шурубор Е.И., Юдин В.С., Кескинов А.А., Красников Б.Ф.	499
PART 3. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE α-KETOGLUTARATE AND α-KETOGLUTARAMATE DISTRIBUTION IN THE BLOOD PLASMA AND ORGANS OF RATS IN VARIOUS MODELS OF HEPATOENCEPHALOPATHY Shurubor E.I., Yudin V.S., Keskinov A.A., Krasnikov B.F.	501
CHROMOSOMAL MECHANISMS OF QUINOLONE-RESISTANT SALMONELLA ISOLATED IN VIETNAM Suzhaeva L.V., Truong N.Q., Egorova S.A., Makarova M.A., Zhamborova M.H., Starkova D.A., Polev D.E., Saitova A.T.	502
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАБОРОВ ДЛЯ ПРЕДОБРАБОТКИ И ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК ИЗ ФЕКАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ Курносов А.С., Глазунова Е.В., Злобовская О.А., Шипулин Г.А.	503
ТБ-ИЗАТЕСТ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЁЗА МЕТОДОМ LAMP И ПЕРСПЕКТИВЫ ДИАГНОСТИКИ В ФОРМАТЕ POINT-OF-CARE Ширшиков Ф.В., Беспярых Ю.А.	505
ИММУННЫЙ СТАТУС ПАЦИЕНТОК В ПЕРИ- И ПОСТМЕНОПАУЗЕ, ЕСТЬ ЛИ РАЗЛИЧИЯ? Аверьянова М.В., Киселева В.В., Вишнякова П.А., Искусных М.Е., Ельчанинов А.В.1,3, Вторушина В.В.1, Кречетова Л.В.1, Фатхудинов Т.Х., Юренева С.В.	505
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ: ПОИСК ВОЗМОЖНЫХ ФАКТОРОВ РИСКА Лямцева А.К., Костюк С.А., Жевнеронок И.В., Полуян О.С.	506
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИГИПОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДИПЕПТИДА Линькова Н.С., Петухов М.Г., Трофимова С.В., Хавинсон В.Х., Attieh K.	508
АНАЛИЗ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ Шанский Я.Д., Комарова А.В., Кузьменко Л. В., Господарик А.В., Есиев С.С., Беспярых Ю.А.	509
ПОЛИПЕПТИДНЫЙ КОМПЛЕКС ХРЯВОЙ ТКАНИ СНИЖАЕТ СИНТЕЗ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ СТАРЕНИИ ХОНДРОЦИТОВ Мякишева С.Н., Линькова Н.С., Медведев Д.С., Рыжак Г.А.	510
РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО / КОЛИЧЕСТВЕННОГО ПРИБОРНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРА СЕПСИСА ПРОКАЛЬЦИТОНИНА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА «АМПЛИТЕСТ® SEPSIS-ИХА» Шипулин Г.А., Тарасова Ж.Е., Костенко С.Н., Свиридова М.А.	511
АКТИВНОСТЬ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ В ЭФФЕКТОРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА Матвеева К.С., Шевырев Д.В.	512
ПОПУЛЯЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ САРМАТОВ И МЕОТОВ НИЖНЕГО ПОДОНЬЯ: ПАЛЕОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АУТОСОМНЫХ STR-ЛОКУСОВ Арамова О.Ю., Вдовченков Е.В., Флоринская В.С., Тищенко А.А., Корниенко И.В.	513

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЖИДКОСТНОЙ И ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИЙ ИЗ МОЧИ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП АНТИДЕПРЕССАНТОВ: ФЛУОКСЕТИН, АМИТРИПТИЛИН, МИРТАЗАПИН Куликова В.К., Новикова Л.С., Киричек А.В., Шабалина А.Э.	514
ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПАРОДОНТОПАТОГЕНОВ С ЦЕЛЬЮ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЛОСТИ РТА. МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД Аронова Е.Б., Дмитриенко М.А., Мороз А.С., Иванова А.	516
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИСТОРИЯ ДРЕВНЕГО НАСЕЛЕНИЯ УРОЧИЩА ЭКИ-ОТТУГ (ЦЕНТРАЛЬНАЯ ТЫВА) В ПЕРИОД НАЧАЛО X ВЕКА ДО Н.Э. – КОНЕЦ X ВЕКА Н.Э. Альборова И.Э., Мустафин Х.Х.	517
X-СЦЕПЛЕННЫЕ CNV И АСИММЕТРИЧНАЯ ИНАКТИВАЦИЯ X-ХРОМОСОМЫ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ Фонова Е.А., Толмачева Е.Н., Кашеварова А.А., Лопаткина М.Е., Никитина Т.В., Лебедев И.Н.	518
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА И АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТАРНЫХ ФЕРМЕНТОВ КАК МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ С РАССТРОЙСТВАМИ ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА В ПОЗДНЕМ ВОЗРАСТЕ Черемных Е.Г., Позднякова А.Н., Прохорова Т.А., Савушкина О.К., Терешкина Е.Б., Бокша И.С., Шешенин В.С.	519
ПАЛЕОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ УЧАСТКОВ D-ПЕТЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК MAMMUTNUS PRIMIGENIUS Тищенко А.А., Арамова О.Ю., Флоринская В.С., Корниенко И.В., Титов В.В.	520
КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ, ОВЕРЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ РЕЦЕПТОРЫ TFR1 И DC-SIGN, ОБЛАДАЮТ ПОВЫШЕННОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТЬЮ К ВИРУСАМ Савенкова Д.А., Алхиреев Д.А., Прудникова Е.Ю., Зайковская А.В., Головки Ю.А., Имамдинов И.Р., Пьянков О.В., Юдкин Д.В.	521
ФЕНОТИПЫ СТАРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА КАК КЛЮЧ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОМУ ПОДХОДУ В ГЕРИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ Мамчур А.А., Шарашкина Н.В., Ерёма В.В., Каштанова Д.А., Иванов М.В., Бруттан М.В., Зеленова Е.А., Шелли Е.М., Остапенко В.С., Джуманиязова И.Х., Маткава Л.Р., Юдин В.С., Акопян А.А., Стражеско И.Д., Майтесян Л.В., Тарасова И.В., Беловшевская О.А., Кескинов А.А., Краевой С.А., Ткачева О.Н., Юдин С.М.	522
ВОЗРАСТНЫЕ ЗАВИСИМОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У КОРЕННЫХ И ПРИШЛЫХ ЖИТЕЛЕЙ АРКТИЧЕСКОЙ ЗОНЫ ЯКУТИИ Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Коганова З.И., Загайнова А.В.	523
ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОСТРУКТУРНОГО ВОЛНОВОДА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ НА МИКРОБНЫЕ КЛЕТКИ Коннова С.С., Лепилин П.А., Скибина Ю.С.	524
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В И С В ОТДЕЛЕНИЯХ ХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ СТАЦИОНАРОВ НИЖЕГОРОДСКОГО РЕГИОНА Полянина А.В., Новоселова А.А., Кашникова А.Д., Зайцева Н.Н.	526

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

A

Abramov V — 287, 288
Alexeenkova S.V. — 361
Marusin Andrey V. — 231
Bocharova Anna V. — 231
Attieh K. — 508

B

Bui Thi Lan Anh — 10
Bui Thi Thanh Nga — 10
Bakaeva A.S. — 417
Balde R. — 271
Bocharova D.V. — 261

C

Chayeb V.A. — 250, 251

D

Dedkov V.G. — 250, 251
Dolgova A.S. — 250, 251
Domoratskaya D.A. — 416

E

Egorova S.A. — 502

I

Ignatyeva I.M. — 416, 417
Ivanova svetlana A. — 231

K

Keskinov A.A. — 481, 491, 501
Kipen V.N. — 379, 388
Krotova A.I. — 261
Kornetov Alexander N. — 231
Koshemetov Zh.K. — 369
Krasnikov B.F. — 481, 491, 501

L

Loschinin M.N. — 361

M

Makarova M.A. — 271, 502
Makavchik S.A. — 261
Makeeva Oksana A. — 231
Malceva O.E. — 361
Mikhailova M.E. — 388
Mokrane A. — 54, 74

O

Orazymbetova N.K. — 369

P

Patrin M.M. — 379
PhamNgocQuang — 10
PhamThiHaGiang — 10
Polev D.E. — 271, 502
Prikhodko S.I. — 416, 417

Romanov A.V.

S

SheykoR.I. — 388
Saitova A.T. — 271, 502
Seisenbayeva M.S. — 369
Shabalina A.V. — 250, 251
Shirobokova S.A. — 250, 251
Shurubor E.I. — 481, 491, 501
Snytkov E.V. — 388
Starkova D.A. — 502
Stepanov Vadim A. — 231
Suzhaeva L.V. — 502
Swarovskaja G. — 231

T

TranThiNhai — 10
Truong N.Q. — 502

U

Umuraliev B.K. — 369

V

Vagaitseva Ksenia V. — 231
VoVietCuong — 10

Y

Yudin V.S. — 481, 491, 501

Z

Zhamborova M. Kh. — 271, 502
Zhuravleva E.A. — 361

A

Абакушина Е.В. — 39
Абашин И.Ю. — 354
Абдрахманова С.А. — 12, 180
Абельская И.С. — 123
Аблаева Р.Н. — 447
Аблова И.Б. — 414
Абрамова М.С. — 90, 92
Абрамычева Н.Ю. — 151, 153, 474, 475
Августинович А.В. — 63
Авдеева А.А. — 253, 470
Авдоница М.А. — 65
Аверьянова М.В. — 505
Авзалетдинов А.М. — 227, 232, 443
Авзалетдинова Д.Ш. — 195
Авчинникова Д.А. — 122
Авшалумов А.С. — 266
Агафонова О.А. — 453
Агеева Е.С. — 447
Агеевец В.А. — 253, 470
Агibalова Л.Т. — 206
Аглетдинов Э.Ф. — 167
Агрба С.Л. — 97

Агумава А.А. — 97
Адельшин Р.В. — 242
Ажойчик Е.В. — 89
Азаров Д.В. — 316
Азнабаева Ю.Г. — 227
Айгинин А.А. — 469
Айрапетов М.И. — 184, 493, 495
Акинина Т.Н. — 371
Акиншина А.И. — 471
Акола Т.В. — 192
Акопян А.А. — 476, 522
Аксенова Е.И. — 125, 276
Алаторцева Г.И. — 9
Александрова А.А. — 191, 450, 459
Александрович В.В. — 157
Алексеев А.Ю. — 235
Алексеева А.С. — 482
Алексеева Е.А. — 60, 275
Алексеева Н.П. — 172
Алексеева Н.Ю. — 105
Алексеева Р.И. — 222
Алешкевич С.Н. — 487
Алешина Н.И. — 85
Алиярова С.И. — 73
Алсет Д. — 193, 226, 444
Алхиреев Д.А. — 521
Альборова И.Э. — 517
Аль-Джавади А.М.А. — 444, 450
Альховский С.В. — 249
Алясова А.В. — 51
Амелина Е.Л. — 276
Амельянович М.Д. — 183
Амосова И.В. — 464
Андаев Е.И. — 242, 244
Андосова Л.Д. — 423
Андрейчук Д.Б. — 323, 325, 326, 330, 331
Андрисясов А.В. — 323, 325, 330
Андреева Э.Ф. — 147
Анисенкова А.Ю. — 300
Антипин Д.А. — 121, 309
Антоненко А.Н. — 281
Антонова Е.Н. — 64
Антонова О.В. — 429
Апалько С.В. — 300
Арамова О.Ю. — 513, 520
Аргун Э.Н. — 97
Ардашелия С.Н. — 97
Арипов В.С. — 237, 450
Ариуа Х. — 51
Аронова Е.Б. — 18, 516
Артеменко Э.С. — 90
Арутюнян И.В. — 62
Аршба И.М. — 97
Асадуллина Д.Д. — 28
Асланов Б.И. — 316
Асташкина Е.А. — 305
Асташонок А.Н. — 432
Астрина О.С. — 85
Атие М. — 433

Афанасьев С.Г. — 63
Афанасьева А.А. — 117, 470
Афанасьева О.М. — 305
Ахба Е.Д. — 401
Ахмадишина Л.З. — 227
Ачкасова М.А. — 437
Аюпова А.Ф. — 155

Б

Бабенко В.В. — 266
Бабкин А.В. — 64
Бабкина И.Н. — 453
Бабовская А.А. — 217
Бабошко Д.А. — 160, 343
Багрянцева О.В. — 375
Бадиков В.Д. — 116
Базарный В.В. — 489
Базылева Е.А. — 200
Байбеков К.С. — 161
Бакштановская И.В. — 462
Балан О.В. — 472
Баландина С.Э. — 451
Баранов О.Ю. — 95, 294
Баранчиков Ю.Н. — 393
Бархатова О.И. — 78
Барышева Н.Н. — 275
Батурина О.А. — 194
Бахтина В.И. — 43, 430, 442
Бахтогаримов И.Р. — 387
Башкирова И.Г. — 403
Безнос О.В. — 478
Безруков О.Ф. — 466
Безуглова Л.В. — 11
Бейманов А.Э. — 228, 283
Белевцев М.В. — 487
Беленикин М.С. — 281
Белова В.А. — 295
Белова Е.В. — 67, 73
Белова О.А. — 244, 247
Белова Ю.И. — 441
Белопольская М.А. — 81
Белошевская О.А. — 522
Белько Е.А. — 487
Беляева С.В. — 451
Белякова В.В. — 288
Березовская М.Ю. — 433
Бермишева М.А. — 26
Беспалова Л.А. — 414
Беспярых Д.А. — 179, 277
Беспярых Ю.А. — 376, 384, 483, 505, 509
Билалов Ф.С. — 67
Билалова А.Б. — 264
Бирюченкова М.В. — 353
Бобрик П.Ю. — 296
Богданов И.И. — 110, 380, 407
Богомазова А.Н. — 381, 383
Богословская Е.В. — 315
Богоутдинов Д.З. — 408
Боженко В.К. — 57

- Бойко Б.В. — 66
Бокуть О.С. — 181
Бокша И.С. — 497, 519
Болдырев Н.Д. — 307
Болотина Е.В. — 486
Болотина Е.С. — 121, 309
Болотникова О.И. — 77
Большаков В.Н. — 18
Бондаренко Г.Н. — 410, 412
Бондаренко Е.И. — 167, 236, 238
Бондарюк А.Н. — 244
Боновска М. — 178
Боргоякова М.Б. — 465
Бордаева О.Ю. — 226
Боровкова Л.В. — 423
Бородин Л.Я. — 171
Борухович Д.Г. — 116
Борухович Л.С. — 116
Бочарова А.В. — 188
Бочарова Д.В. — 261
Бочкарев М.В. — 221
Брага Э.А. — 29, 44, 45, 47
Бржозовская Е.А. — 305
Бронин Г.О. — 286, 483
Бруснигина Н.Ф. — 275
Бруттан М.В. — 522
Брызгалова Д.А. — 86
Брынза Н.С. — 245
Брюккель А.Г. — 433
Брежнева С.О. — 453
Брюсова М.Б. — 339, 372
Брюшкова Е.А. — 424
Булгакова А.З. — 195
Булычева Ю.И. — 249
Буракова А.А. — 69, 71
Буракова И.Ю. — 362
Бурбаева Г.Ш. — 497
Бурдённий А.М. — 29, 44, 47
Буре И.В. — 60
Бурмистров Е.М. — 276
Бурмистрова А.Л. — 482
Бурханова Г.Ф. — 427
Бурцев Д.В. — 199
Бурцев Е.А. — 286
Бурцева Е.И. — 320
Буслов К.Г. — 208
Бутенко А.М. — 249
Бутенко Е.В. — 193, 211
Бутяев Р.В. — 440
Бучарская А.Б. — 203
Бушаев А.А. — 433
Бушуева О.Ю. — 191, 209
Быковская М.А. — 433
Бычков В.Г. — 245
Бычков Е.Р. — 495
Бьядовская О.П. — 334
- Вакин В.С. — 464
Варнавальская О.В. — 167
Вартанян Т.А. — 262
Василиадис Ю.А. — 295
Васильева А.В. — 212
Васильева Е.Ф. — 484
Васильева И.А. — 161
Васильева Н.В. — 390
Васильцова Н.Н. — 324, 335
Вафин Р.Р. — 356
Вдовина Е.Т. — 85
Вдовченков Е.В. — 513
Ведерникова А.А. — 262
Великжанина Е.И. — 109
Величко Х.А. — 79
Веретенникова А.А. — 15
Вертелко В.Р. — 487
Верчук А.Н. — 135, 136, 138, 139, 419
Вершинин П.Е. — 162
Веселова Е.В. — 161
Веселовский Е.М. — 67, 73
Ветохина А.В. — 270, 274
Ветчинкина Е.А. — 60
Вечканов Е.М. — 448, 460
Вилисова А.Н. — 9
Винокуров А.С. — 161
Виссарионов С.В. — 208
Вишняков К.Н. — 399
Вишнякова П.А. — 62, 505
Владимиров К.Б. — 165
Водопьянов С.О. — 114
Волков И.А. — 35, 299
Волкова М.А. — 326, 331
Волкова Н.В. — 237, 450
Волкова Т.О. — 32, 33
Володина Е.А. — 399
Волосникова Е.А. — 246
Вольчик В.В. — 198, 202
Воробей А.В. — 102, 106, 205
Воробьева Е.А. — 497
Воронцов Р.Н. — 152
Воронин К.А. — 214
Воронина Е.С. — 203
Воронина О.Л. — 125, 276
Воронкова О.В. — 240
Воронова Е.А. — 79
Воропаев Е.В. — 95, 294
Воропаева А.В. — 24, 95
Вострикова О.В. — 371
Вторушин С.В. — 63
Вторушина В.В. — 505
Вторушина И.А. — 453
Вылчева В. — 178
Вытнова Н. — 67
Вяжевич А.Н. — 238
Вязовая А.А. — 21, 168

В
Вагайцева К.В. — 127, 128, 188

Г
Габидуллина Д.Э. — 367

- Гаджиев А.А. — 235
Галанин В.В. — 43, 430, 442
Галицкая С.С. — 123
Галямина М.А. — 266
Гамова Н.А. — 78
Ганьшина Д.А. — 495
Гапеенко Е.В. — 25
Гапонова Т.В. — 461
Гаранджук А.И. — 442
Гарафутдинов Р.Р. — 427
Гашникова М.П. — 260
Гашникова Н.М. — 260, 343
Гейдаров Р.Н. — 319
Герасименко А.А. — 114
Герасимова А.А. — 168
Герашенко Т.С. — 55
Гервас П.А. — 55
Гергель М.А. — 381, 383
Гибадуллин И.А. — 227, 232, 443
Гильманов Х.Х. — 336, 356
Гилязова Г.Р. — 28
Гилязова И.Р. — 28
Гирсова Н.В. — 407, 414
Гишян А.А. — 256
Глазунова Е.В. — 498, 503
Глинкина Т.В. — 189, 192
Глотов А.Г. — 352
Глотов О.С. — 295
Глотова Т.И. — 352
Глущенко Е.Е. — 252, 254, 258, 279
Гнусарева Н.И. — 469
Голева О.В. — 470
Голидонова К.А. — 241
Голикова О.А. — 105
Головко Ю.А. — 521
Голоенко И.М. — 181
Голубева Т.С. — 181
Гомбоц С. — 398, 420
Гомон Ю.М. — 470
Гончаренко А.М. — 14
Гончаров А.Е. — 316
Гончаров Н.Е. — 99
Гончаров С.В. — 57
Гончарова Е.Н. — 367
Гончарова О.И. — 57
Горбач Е.И. — 55
Горбачев А.Ю. — 107, 266
Горбачева Н.С. — 339, 372
Горбенко А.С. — 43, 59, 430, 442
Горбенко Д.А. — 117, 262, 433
Горбова И.В. — 470
Горбич Ю.Л. — 267
Гордон К.Б. — 62
Гордукова М.А. — 103, 111
Гореленко М.В. — 444
Горелова Н.Б. — 241
Горина Л.Г. — 78
Городничев Р.Б. — 265, 277
Горохов И.А. — 99
Горяйнова О.С. — 77
Господарик А.В. — 483, 509
Гостев В.В. — 470
Готфрид Л.Г. — 160
Грачева А.Н. — 167
Грачева А.С. — 468
Грачева Л.А. — 285
Грачева Ю.А. — 208
Гребень Н.Ф. — 181
Гремза К.С. — 50
Грехнева А.Д. — 323, 326
Гречишникова Д.А. — 269
Григоренко В.Г. — 260
Григорьева Т.В. — 67, 73
Григорьева Т.Д. — 81
Гринвальд Е.Н. — 12
Грищенко М.Ю. — 27
Груббер И.М. — 305
Грудинин М.П. — 84, 89, 464
Грядунев Д.А. — 118, 429
Грязнова М.В. — 362
Губин Д.Г. — 214
Гузеева А.А. — 415
Гуков Б.С. — 293
Гурьянова И.Е. — 487
Гурзу З.Г. — 375
Гусакова М.С. — 68, 471, 476
Гусева Н.А. — 323, 326
Гусина А.А. — 158
Гуськова О.Н. — 52
Гутникова Л.В. — 450, 459
Григорян Д.А. — 303
- Д**
Давидовский С.В. — 189
Давыдова Е.Е. — 95, 103, 111, 359
Дададжанов Д.Р. — 117, 262
Даниленко А.В. — 307
Даниленко Н.Г. — 157
Данилов Д.И. — 252, 254, 258, 279
Данилова В.С. — 252, 258, 279
Дё К.Г. — 152, 457
Девальд И.В. — 223
Девятов А.А. — 95, 103, 111, 359
Дедков В.Г. — 424, 431
Дедова А.В. — 320
Дедова Л.В. — 320
Деев Р.В. — 301
Дементьева Е.В. — 498
Дементьева Е.И. — 118, 429
Демиденко А.Н. — 61
Демин А.Г. — 203
Демина О.К. — 167, 238
Денисов Е.В. — 34, 55
Дергачева Н.И. — 206
Дерябина С.С. — 151
Дерябин Д.Г. — 118
Деревянчук Е.Г. — 226
Десятерик А.А. — 400

Дехнич А.В. — 122
Дешева Ю.А. — 304
Джавахия В.Г. — 414
Джинджолия В.Г. — 97
Джуманиязова И.Х. — 476, 522
Диденко Я.В. — 211
Димитрова А. — 178
Дмитриев А.В. — 81
Дмитриев В.А. — 10
Дмитриева А.А. — 423
Дмитриенко М.А. — 516
Добыш О.Г. — 69, 71, 186
Добыш О.И. — 75, 185, 228, 230, 283
Догадов Д.И. — 14
Докукина Т.В. — 181
Долгова А.С. — 257, 313, 424, 431
Долинская К.Г. — 327, 329, 372
Долматович Т.В. — 141, 142, 366
Домонова Э.А. — 391
Доморацкая Д.А. — 413
Донская М.А. — 311
Дохов М.А. — 30
Дренова Н.В. — 394, 404
Дроздова Е.Л. — 215
Дубовицкий Н.А. — 235
Дуданова О.П. — 212
Дыбов О.Г. — 102, 106, 205
Дьякова М.Е. — 165, 172
Дюжев Ж. — 67
Дюкина Т.В. — 121
Дядюра Е.Н. — 447

Е

Евсеенко О.В. — 284
Евдокимов К.М. — 475
Егоров М.В. — 140
Егоров А.М. — 260
Егорова М.Л. — 324, 335
Едер В.А. — 318
Елисеева Л.В. — 191
Елфимов К.А. — 160, 343
Ельчанинов А.В. — 62, 505
Емельянова М.А. — 429
Епифанова А.В. — 64
Епифанова Н.В. — 98, 109
Ерема В.В. — 471, 476, 522
Ереско С.О. — 184, 493, 495
Ермаков А.И. — 164
Ермаченко Е.Д. — 21, 488
Ерофеева А.-М.В. — 40
Есиев С.С. — 509
Есимова И.Е. — 240
Есина Т.И. — 246
Ефанова Е.В. — 191, 209
Ефременко А.А. — 393
Ефимова А.А. — 142
Ечешева А.В. — 236

Ж

Жалейко З.П. — 82, 248
Жалсанова И.Ж. — 34
Жамборова М.Х. — 314
Жангазиева К.Х. — 12, 180
Жаранкова Ю.С. — 487
Жгун Е.С. — 483
Жданов К.В. — 470
Жевнеронок И.В. — 506
Железняков В.С. — 221
Жестков П.Д. — 325, 330
Жибурт Е.Б. — 284
Живаева Т.С. — 403, 405
Жигалин А.В. — 235
Жиганова М.С. — 64
Жилина С.С. — 155
Жиравковская Е.В. — 309
Жирков А.А. — 470
Жолдасова Е.А. — 13
Жолинский А.В. — 301
Журавлев В.Ю. — 168
Журавлев Д.И. — 105
Журенкова О.Б. — 244, 247
Журиков Р.В. — 39
Жуховицкий В.Г. — 297

З

Забровская А.В. — 256
Заброда Е.А. — 221
Заваденко Н.Н. — 155
Загайнова А.В. — 523
Загидуллин Н.Ш. — 227, 232, 443
Задорожный А.М. — 465
Зайковская А.В. — 521
Зайцев С.С. — 101
Зайцева А.И. — 175
Зайцева Е.В. — 381
Зайцева Н.Н. — 525
Зайцева И.А. — 214
Зайчикова М.В. — 179, 265
Закирова А.М. — 171
Замулаева И.А. — 66, 197
Зарубин А.А. — 34, 55
Зарубин А.И. — 217
Заседателев А.С. — 429
Захаренко М.В. — 57
Захаренко С.М. — 470
Захаров В.М. — 322
Захарова Е.Ю. — 146
Захарова М.Н. — 474
Захарова О.Г. — 116
Зверев В.В. — 9
Звягинцев В.Б. — 396
Зеленова Е.А. — 476, 522
Здзярская О.Л. — 442
Зеленова Е.А. — 476
Зигангирова Н.А. — 276
Зима Д.В. — 466
Зименков Д.В. — 429

Зиннатуллина Г.Ф. — 26
 Зиняков Н.Г. — 323, 325, 326, 330, 331
 Злобовская О.А. — 498, 503
 Зозуля Н.И. — 156
 Зотова О.В. — 228, 283
 Зубарева А.С. — 30, 439
 Зубарева Т.С. — 30, 426, 439, 441
 Зубашева М.В. — 297
 Зулкарнеев Р.Х. — 232, 443
 Зулкарнеев Ш.Р. — 227, 232, 443
 Зыкова Г.С. — 191
 Зыкова Т.А. — 83, 445
 Зяблицкая Е.Ю. — 466
 Зятков А.А. — 94, 294, 434

И

Иванов А.В. — 410, 454
 Иванов М.В. — 67, 73, 471, 476, 522
 Иванова А. — 516
 Иванова А.А. — 318
 Иванова А.С. — 157
 Иванова Е.А. — 28
 Иванова Е.С. — 460
 Иванова Н.А. — 44
 Иванова Т.И. — 77, 197
 Иващенко Л.О. — 396
 Игнатиади Ю.В. — 201
 Игнатова П.Д. — 493, 495
 Игнатъева О.А. — 470, 471
 Иголкин А.С. — 341, 344, 348, 357, 360
 Ид М. — 444, 449
 Идутова М.К. — 18
 Измайлов А.А. — 28
 Иконникова А.Ю. — 429
 Иллариошкин С.Н. — 151, 153, 190, 475
 Ильичёва Е.Ю. — 150
 Ильичёв А.А. — 237, 450, 465
 Иматдинов А.Р. — 467
 Иматдинов И.Р. — 467, 521
 Имашпаев Д.М. — 12
 Имекина Д.О. — 220
 Исаева А.А. — 237, 246, 450
 Исакова Ж.Т. — 385
 Искусных М.Е. — 505
 Истомина Е.А. — 394

К

Кабилев М.Р. — 194
 Кавун А.И. — 67, 73
 Кадыкова А.И. — 301
 Кадырова И.А. — 264, 312
 Кадырова Р.А. — 464
 Казубская Т.П. — 29, 44, 47
 Казуль Г.А. — 176
 Казюлина А.А. — 161
 Кайгородова Е.В. — 27
 Какурина Г.В. — 31
 Калашников А.Е. — 322
 Калинина Н.А. — 56

Калинина О.В. — 10
 Калинин А.И. — 60
 Калиногорская О.С. — 470
 Калугина Ю.А. — 167
 Камаев И.О. — 418
 Камалов М.Н. — 17
 Камалова Э.Р. — 94
 Кан Н.Г. — 13
 Кандинов И.Д. — 118, 429
 Канестри В.Г. — 391
 Капитова И.А. — 402, 415
 Капитонова М.А. — 431
 Каракай М.В. — 406
 Карал-оглы Д.Д. — 14
 Карань Л.С. — 244, 247
 Карганова Г.Г. — 244, 247, 313
 Каримова Е.В. — 403
 Карлсен А.А. — 14, 16
 Карпенко М.Н. — 150
 Карпенко Л.И. — 465
 Карпов Д.С. — 297
 Карпова Т.И. — 125
 Карпун Н.Н. — 398
 Карташов М.Ю. — 17
 Карташова А.Д. — 74
 Касимов А.Э. — 152, 457
 Кастальева Т.Б. — 408, 414
 Качанко Е.Ф. — 123
 Качиева З. — 180
 Кашеварова А.А. — 518
 Кашина Ю.Г. — 404
 Кашникова А.Д. — 525
 Кашников А.Ю. — 109
 Каштанова Д.А. — 470, 471, 476, 522
 Цветная Т.В. — 492
 Цветной И.М. — 30
 Кемстач В.В. — 221
 Кескинов А.А. — 471, 479, 490, 499, 522
 Киласония Э.Ф. — 97
 Кильчевский А.В. — 36, 138
 Кипень В.Н. — 69, 71, 75, 129, 132, 185, 186, 228, 230, 283, 363, 354
 Киприянова Н.А. — 176
 Киреев Д.Е. — 159
 Киричек А.В. — 514
 Кириченко А.А. — 159, 420
 Кириченко А.Д. — 424
 Кириченко Н.И. — 398
 Кирсанова Н.А. — 333, 381, 383
 Кирьянова К.А. — 472
 Кирюхина Л.Д. — 172
 Кисакова Л.А. — 465
 Киселев И.С. — 194
 Киселева А.Э. — 60
 Киселева В.В. — 505
 Киселева В.И. — 66
 Киселева Е.В. — 289
 Киселева И.В. — 318
 Кичемазова Н.В. — 101, 320

- Климина К.М. — 483
Климкович Н.Н. — 61
Климова Е.А. — 125
Клыч А.В. — 40
Клюшников С.А. — 153, 475
Клясова Г.А. — 270, 272, 274
Князева Т.Д. — 523
Ковалев А.В. — 59
Ковалев М.А. — 297
Коваленко А.В. — 219
Коваленко Д.Г. — 25
Коваль Н.О. — 272
Ковчур О.И. — 32, 33
Ковчур П.И. — 19, 32, 33
Ковш Е.В. — 186
Коганова З.И. — 523
Кожанова Т.В. — 155
Козаченко М.Г. — 123
Козлов А.А. — 323, 326, 331
Козлов В.А. — 9
Козлов К.Л. — 492
Козлов Р.С. — 123
Козлова А.Д. — 339, 372
Козырева И.В. — 295
Козырева Н.Г. — 354
Колбасов Д.В. — 351
Колегова Е.С. — 34
Колесников Н.А. — 127, 128
Колобова С.О. — 423
Коломейчук С.Н. — 214, 221
Колоджиева В.В. — 316
Колосова Н.П. — 307
Колпашиков Д.М. — 169, 433
Кольцов А.Ю. — 345
Кольцова Г.С. — 345
Коляда Н.А. — 420
Комаров А.А. — 367
Комарова А.В. — 483, 509
Комаровский Ю.Ю. — 43
Комиссаров А.Б. — 318
Комиссарова С.М. — 141, 142
Комова Д.М. — 90, 92
Комова Е.Г. — 149, 182
Кондакова И.В. — 31
Кондратенко Г.Г. — 69, 71
Кондратович В.А. — 69, 71
Кондратьев М.О. — 394, 403
Кононов А.В. — 393
Коннова С.С. — 524
Кононова Л.А. — 34
Коноплина К.М. — 56
Копенкин М.А. — 489
Копылова Н.В. — 304
Коренева Г.В. — 149
Коренберг Э.И. — 241
Коржанова М. — 318
Корнева В.А. — 218
Корниенко И.В. — 277, 513, 520
Корниенко М.А. — 265
Коровин О.А. — 51
Королева Е.А. — 276
Королева Т.С. — 228, 283
Коростин Д.О. — 295
Коростовцева Л.С. — 221
Корытина Г.Ф. — 195, 227, 232, 233, 443
Косенко М.Н. — 324, 335, 467
Косенков А.В. — 469
Кособокова Е.Н. — 56
Костенко С.Н. — 511
Костюк С.А. — 20, 61, 102, 106, 119, 189, 192, 204, 205, 267, 506
Косякова Г.П. — 495
Котенева С.В. — 352
Кофанов Е.Л. — 55
Кочетова О.В. — 195, 227
Кочкин Р.О. — 350
Кочконян А.А. — 14
Кошметов Ж.К. — 368
Кравцов Д.В. — 118, 429
Кравцов И.С. — 64
Краевой С.А. — 476, 522
Крапивкин А.И. — 155
Красников Б.Ф. — 479, 490, 499
Красникова М.С. — 327, 329, 339, 372
Краснов М.Ю. — 475
Краснова Е.И. — 238
Краснова С.В. — 85
Красногорова Н.В. — 51
Краснослободцев К.Г. — 320
Крепкая А.С. — 320
Кречетова Л.В. — 505
Кривицкая В.З. — 84
Кривошеина Е.И. — 17
Кривуля А.О. — 265
Крикунова Л.И. — 66, 197
Криницына А.А. — 281
Кротова А.О. — 334
Кротова А.Л. — 261
Крохин А.А. — 451
Круглов А.Н. — 470
Круть И.В. — 170
Крылова Е.В. — 333, 371, 381, 383
Крылова А.Ю. — 461
Крылова Н.А. — 78
Крыленков В.А. — 316
Крылова Ю.С. — 30
Ксенафонтов А.Д. — 318
Кубанов А.А. — 118
Кудинова Е.А. — 57
Кудинова Е.В. — 289
Кудров Г.А. — 465
Кудрявцева Е.В. — 151
Кудрявцева А.В. — 155
Кузина Е.С. — 260
Кузнецов С.И. — 284, 289
Кузнецова Е.А. — 22, 162
Кузнецова Е.Б. — 60
Кузнецова И.В. — 92

Кузнецова О.А. — 73
 Кузовлев А.Н. — 468
 Кузьменко Л.В. — 376, 384, 483, 509
 Кузьмин А.И. — 343
 Кузьмин О.В. — 16, 64
 Куклина Н.Г. — 65
 Куклянова В.В. — 313
 Кукота И.И. — 15
 Кулагин В.В. — 159
 Кулагина Е.В. — 429
 Кулаева Е.Д. — 226
 Кулаков В.Г. — 399
 Кулакова О.Г. — 194
 Кулакова Ю.Ю. — 399
 Кулешов В.Г. — 258
 Куликова В.К. — 514
 Куликова Д.Б. — 448
 Куликова С.Л. — 157
 Кулинич Т.М. — 57
 Кульбакин Д.Е. — 34
 Кунда М.С. — 125, 276
 Кундас Л.А. — 41, 46, 50
 Куприянов В.В. — 320
 Курбатова И.В. — 212
 Курмышкина О.В. — 32, 33
 Курносов А.С. — 498, 503
 Курносов И.А. — 42
 Кустова М.А. — 125
 Кутилин Д.С. — 52
 Куцевалова О.Ю. — 270
 Кушлинский Н.Е. — 29, 44
 Кюрегян К.К. — 14, 16

Л

Лавриненко А.В. — 264, 312
 Лаврухин М.С. — 101, 320
 Лавряшина М.Б. — 173, 176, 220
 Лазарев С.Д. — 245
 Лазарева А.В. — 319
 Лазарева Е.Н. — 85
 Лазебная И.В. — 338
 Лазебный О.Е. — 338
 Лагутина О.В. — 151
 Ланцова М.С. — 155
 Ларионова О.С. — 101, 320
 Ларкина А.П. — 195, 227
 Латышева М.Н. — 285
 Лебедев А.А. — 67, 73, 495
 Лебедев И.Н. — 425, 518
 Лебедев П.В. — 159
 Лебедева А.А. — 67
 Лебедева Л.А. — 82, 248
 Лепилин П.А. — 524
 Лебеденко А.А. — 201
 Левашов П.А. — 278
 Левашова О.А. — 105
 Лемеш В.А. — 69, 71, 75, 185, 186, 228, 230, 283
 Ликольд Е.Б. — 270, 272, 274
 Линькова С.В. — 146

Линькова Н.С. — 492, 508, 510
 Лиознов Д.А. — 464
 Лисица Т.С. — 68
 Лисовая Д.Д. — 470
 Лисок А.В. — 18, 21, 488
 Литов А.Г. — 244, 247
 Лихачева Е.А. — 156
 Лихолетова Д.В. — 470
 Личман Ж.С. — 288
 Личная Е.В. — 10
 Логинов В.И. — 29, 44, 45, 47
 Логинова А.М. — 235
 Логинова О.П. — 24
 Лозовая Е.Н. — 403, 405
 Локтев В.Б. — 246
 Ломакин А.А. — 110, 380, 407
 Ломтева С.В. — 211
 Лопаткина М.Е. — 518
 Лопатовская К.В. — 242, 244
 Лошкарёв Р.И. — 471
 Луганская П.С. — 169
 Лукина С.С. — 29, 44, 47
 Лупарев А.Р. — 95, 103, 111, 359, 469
 Лухверчик Л.Н. — 9
 Луцкович Д.В. — 40
 Лыкова К.О. — 426
 Любушкин А.В. — 487
 Лялина Л.В. — 21
 Лямцева А.К. — 20, 119, 189, 192, 506
 Лянгасова О.В. — 191, 211
 Ляпина А.М. — 101, 320

М

Мавричев С.А. — 25
 Маджарова О.А. — 123
 Мазлум А. — 341, 344, 348, 357, 360
 Майорова А.А. — 35
 Майорова О.А. — 288
 Майтесян Л.В. — 522
 Макавчик С.А. — 522
 Макаров В.В. — 470, 471, 476, 498
 Макарова М.А. — 314
 Макеева О.А. — 188
 Макенов М.Т. — 244, 247
 Маковецкая Г.А. — 210
 Максимов И.В. — 427
 Малахова М.В. — 265, 277
 Малёваная И.А. — 183
 Малеев В.В. — 85
 Малек А.В. — 42
 Мальхина М.А. — 453
 Мальченкова А.А. — 56
 Мальчикова А.О. — 272, 274
 Мамедов И.С. — 154, 494
 Мамедова З.Э. — 206
 Мамчур А.А. — 476, 522
 Мандра Ю.В. — 489
 Маньковская С.В. — 40
 Марзанова С.Н. — 350

- Маркелов В.А. — 227, 232, 443
Маркина Е.В. — 11
Маркина Т.А. — 249
Марков А.А. — 214
Маркова Д.С. — 155
Маркова Ю.М. — 378
Марникова Д.П. — 158
Мартинков В.Н. — 53
Мартынова А.В. — 255
Марусин А.В. — 188
Марченко В.Ю. — 307, 324, 335
Маслякова Г.Н. — 203
Мастиленко А.В. — 110, 380, 407
Матвеев Н.М. — 495
Матвеева К.С. — 512
Матвеева Н.А. — 200
Маткава Л.Р. — 470, 476, 522
Махлай А.А. — 64
Махова М.А. — 275
Мацвай А.Д. — 253, 273, 293, 303, 469
Машкина Е.В. — 198, 201, 202, 210, 213, 224
Машков О.И. — 67
Медведев Д.С. — 510
Медведь А.В. — 41, 46
Межакова М.С. — 214
Мезиров Г.Г. — 203
Мейгал А.Ю. — 214
Мейер А.В. — 173, 220
Мелешко А.Н. — 40
Мелкумян А.Р. — 125
Мельникова О.В. — 242, 244
Мельникова Т.Ю. — 204
Меньшикова Е.А. — 114
Мечетина Л.В. — 450
Мещерякова Н.Г. — 206
Мигяев О.К. — 67
Микова В.М. — 471
Микулович Ю.Л. — 175
Микуляк Н.И. — 105
Милейко В.А. — 67, 73
Минаев М.Ю. — 370, 373
Минаева А.Н. — 110
Минаева Л.П. — 378
Миносян А.А. — 14
Миронова Е.С. — 30
Мирошникова В.В. — 146
Мисько О.Н. — 461
Митрофанов С.И. — 471
Михайлец Э.С. — 74
Михайлов М.И. — 14, 16
Михайлова А.А. — 495
Михайлова Г.Ф. — 38
Михайлович В.М. — 319
Михайлова М.Е. — 363, 364
Михайловский Н.В. — 39
Михайлычева М.В. — 266
Михаленко Е.П. — 36
Мишагин В.П. — 245
Мкртчян Л.С. — 66, 197
Могильных А.К. — 453
Можейко Л.Ф. — 20, 119
Мокин Е.Н. — 221
Мокроусов И.В. — 168, 178
Молчанова И.В. — 270
Момотюк К.С. — 288
Монахов Н.Э. — 164
Мороз А.С. — 18, 516
Морозик П.М. — 183
Морозкин Е.С. — 244, 247
Морозов А.В. — 214
Морозов Е.Н. — 245
Морозов К.В. — 174
Морозова Г.А. — 286
Морозова Е.О. — 344
Морозова О.В. — 109
Морозова П.Д. — 362
Мосенко С.В. — 300
Мотлохова Е.А. — 240
Мочалова Е.С. — 496
Мудрак Д.А. — 203
Мукашева Е.А. — 320
Мурашова Е.К. — 412
Мурзаева А.В. — 38
Муртазалиев Х.Х. — 314
Муружева З.М. — 150, 206
Мусаева Т.Д. — 318
Мустафин Х.Х. — 517
Муха Т.А. — 15
Мякишева С.Н. — 510
Мясников С.О. — 158
- Н**
Набережнов Д.С. — 438
Наврүзова Л.Н. — 85
Назаренко М.С. — 436
Назарова Е.Л. — 47
Насибуллин Т.Р. — 225, 233
Наумова Е.С. — 162
Нафеев А.А. — 110
Наякшин А.М. — 450
Невзорова В.А. — 435
Невзорова К.В. — 190
Некрасов Б.Г. — 453
Некрасов А.Ю. — 68
Немцова М.В. — 60
Несмеянова В.С. — 246, 450
Нестеренко Л.Н. — 9
Нетесова И.Г. — 11
Нефедченко А.В. — 352
Нефедьева М.В. — 351
Ни О.Г. — 470
Никитин А.Г. — 49
Никитина В.А. — 21
Никитина В.В. — 219
Никитина Е.В. — 470
Никитина Т.В. — 425, 518
Николаева А.Н. — 13
Николаева Л.И. — 320

Николаева М.А. — 350
Никонова З.Б. — 323, 326
Никонорова И.В. — 79
Ниязова С.С. — 141, 142
Новико В.В. — 51
Новиков Д.В. — 51
Новикова Л.С. — 514
Новикова Н.А. — 98, 109
Новоселова А.А. — 525
Нодель М.Р. — 478
Носкова Т.В. — 470
Носова А.О. — 315
Носова В.О. — 448, 460
Ностаева А.В. — 300
Нужный Е.П. — 153
Нургалиев Ф.М. — 336
Нурмуканова В.А. — 253, 273

О

Обижаева Е.С. — 164
Объедков В.Г. — 181
Овчарова Е.С. — 342, 346
Овчинникова Е.В. — 323, 325, 326, 330
Овчинникова Е.Н. — 461
Оглодина Д.Г. — 320
Одинцова Т.И. — 394
Озерова А.Н. — 462
Олехнович Е.И. — 483
Ольховик Т.И. — 442
Ольховский И.А. — 43, 59, 430, 442
Онхонова Г.С. — 307, 324, 335, 467
Опарина С.В. — 98
Оразымбетова Н.К. — 368
Орлов П.С. — 67
Орлов Ю.Л. — 35, 299
Орловский А.А. — 391
Осипенко С.И. — 221
Осипкина О.В. — 95
Осипов А.П. — 349
Осипова К.В. — 155
Осипова О.С. — 325, 330
Осипова Ю.А. — 333, 371
Оснач В.А. — 257
Останкова Ю.В. — 458
Остапенко В.С. — 522
Офицеров В.И. — 167, 238

П

Павленко Е.В. — 170
Павленко Т.А. — 478
Павлов В.Н. — 28
Павлов В.С. — 155
Павлов К.В. — 401
Павлова О.Н. — 49
Павлова О.С. — 186
Павлова П.А. — 470
Пай Г.В. — 161
Пальцева Е.М. — 30
Панкова О.В. — 55

Панова А.Е. — 161, 167
Панова Э.В. — 472
Пантелеев А.М. — 168
Паткин Е.Л. — 206
Патрин М.М. — 129
Пахарукова М.И. — 22
Пахомова И.В. — 55
Пашенова Н.В. — 393
Пашкевич А.М. — 50
Певзнер А.В. — 200
Перевезенцев О.А. — 154, 199
Перельмутер В.М. — 55
Перепечина И.О. — 130
Перцовая А.А. — 393
Петецкая В.Н. — 370
Петрова Д.Н. — 446
Петрова Е.Р. — 84
Петрова Л.В. — 285
Петрова О.А. — 10
Петухов М.Г. — 508
Пилипенко В.В. — 222
Пилипко С.С. — 309
Пименова В.В. — 199
Пинчук Т.В. — 20, 119
Пинегина Ю.С. — 149
Пинюгина М.В. — 56
Писарева М.М. — 318
Платицина О.В. — 245
Плехова Н.Г. — 435
Плешков В.Ю. — 253
Плотников А.А. — 448, 460
Плотникова Л.В. — 74, 440
Плотникова О.А. — 222
Плотникова Ю.К. — 162
Побегуц О.В. — 266
Позднякова А.Н. — 519
Позднякова Е.А. — 289
Позднякова Л.Л. — 238
Покатова О.Ю. — 169
Покудина И.О. — 193, 444, 450
Покусаева В.Н. — 122
Полев Д.Е. — 99
Полищук Р.С. — 140
Полещук Н.Н. — 432
Полковникова И.А. — 300
Половкова О.Г. — 17
Полоников А.В. — 191, 209
Полоникоа А.А. — 209, 215
Полуконова Н.В. — 203
Полушина Л.Г. — 489
Полуэктова В.Б. — 455
Полуян О.С. — 20, 102, 106, 119, 189, 192, 204, 205, 506
Полькин В.В. — 62
Поляков А.П. — 62
Поляков Н.Б. — 297
Поляков С.А. — 429
Полякова В.А. — 96, 103, 111, 359
Полякова В.И. — 97
Полякова Е.А. — 487

Полякова П.А. — 162
Полянина А.В. — 525
Поляничко А.М. — 74, 440
Поникаровская Н.Г. — 295
Пономарева А.А. — 55
Пономарева О.А. — 162
Попенко Л.Н. — 253
Попков В.М. — 203
Попкова М.И. — 86
Попович Ю.С. — 311
Порецкова Г.Ю. — 210
Портянко А.С. — 41, 46, 50
Порываева В.А. — 11, 453
Постников П.В. — 496
Потанина Д.В. — 81
Потапова А.А. — 11
Походня Е.Н. — 181
Походня Ю.Г. — 181
Почуева В.В. — 497
Преснова Г.В. — 260, 349
Приходько С.И. — 405, 406
Приходько Ю.Н. — 403
Прокофьев В.Н. — 460
Пронина И.В. — 29, 44, 45, 47, 496
Протопопова А.О. — 153, 475
Протопопова Е.В. — 246
Прохоров Т.А. — 484, 497, 519
Прохорова Н.Д. — 483
Проценко А.Р. — 190, 474
Прудникова Е.Ю. — 467, 521
Пучкова Л.В. — 150
Путилов А.А. — 214
Путинцева А.В. — 333, 381, 383
Пухликова Т.В. — 288
Пушкин А.А. — 42
Пчелина С.Н. — 146
Пчельников А.В. — 327, 329
Пшеничникова О.С. — 156
Пылаев Т.Е. — 203
Пьянзова Т.В. — 173, 176
Пьянков О.В. — 237, 465, 521
Пьянков С.А. — 237

Р

Раджабов М.О. — 128
Раковская И.В. — 78
Раменская М.В. — 413
Рассолова С.В. — 288
Растрига Н.В. — 278
Ратушный М.В. — 62
Рачина С.А. — 258
Ребриков Д.В. — 295
Ревизор А.О. — 162
Ревкова М.А. — 281
Резник В.И. — 82, 248
Репинская Ж.А. — 295
Репникова Е.Г. — 453
Решетникова И.Д. — 94, 446, 456
Ринейская Н.М. — 141

Рогачева А.В. — 459
Рожков О.А. — 343
Романцова А.С. — 55
Романенко В.Н. — 240
Романов А.В. — 123
Романов А.С. — 488
Романова К.А. — 319
Романова С.В. — 469
Ромашевская И.П. — 53
Рубель М.С. — 117, 169, 433
Рубцова М.Ю. — 260, 349
Рудакова С.В. — 345
Руденкова Т.В. — 61, 189, 192, 267
Руднева Н.С. — 122
Рудомётов А.П. — 465
Рукавишников М.Ю. — 453
Румянцев А.Л. — 285
Румянцева А.М. — 476
Румянцева В.Д. — 183
Рыбачук В.А. — 39
Рыболовлева Т.Н. — 47
Рыжак Г.А. — 510
Рыжиков А.Б. — 307, 324, 335, 467
Рыжова Н.Н. — 125, 276
Рымаренко Н.В. — 447
Рябинин И.А. — 390
Ряховский С.С. — 42
Рящина А.Н. — 145

С

Саванович И.И. — 183
Савватеева Е.Н. — 429
Савенкова Н.Д. — 147
Савенкова Д.А. — 521
Савина Е.А. — 299
Савицкий Д.В. — 492
Савова-Лалковска Т. — 178
Савосина Л.В. — 82, 248
Савочкина Ю.А. — 252, 253, 254, 158, 279, 469
Савушкина О.К. — 484, 497, 519
Савчук Т.Н. — 12
Садеева З.З. — 319
Садчикова А.С. — 344, 348, 357, 360
Сазанович Н.С. — 366
Сайтгалина М.А. — 458
Саломашкина В.В. — 144, 156
Самитова А.Ф. — 295
Самсонова Ж.В. — 349
Санькова Т.П. — 149
Санькова М.В. — 455
СAPERкин Н.В. — 263
Саранюк Р.В. — 191, 209
Сарпова М.В. — 47
Сасина Л.К. — 206
Саусакова С.Б. — 12, 180
Саушкин Н.Ю. — 349
Сафина Л.Ф. — 94
Сахабутдинова А.Р. — 427
Сахарнов Н.А. — 86

- Сачко А.М. — 77
Сашина Т.А. — 109
Свешникова Е.Д. — 65
Свиридова М.А. — 511
Свирин К.А. — 17
Свиричев Ю.В. — 221
Святченко В.А. — 246
Святченко С.В. — 307
Седашкина О.А. — 210
Седова И.Б. — 378
Сейсенбаева М.С. — 368
Селявкин С.Н. — 404
Селянская Н.А. — 114
Семенова Е.В. — 454
Семенова П.А. — 435
Семенцова Е.А. — 489
Семерник О.Е. — 201
Сенина М.Д. — 263
Сергеев Г.В. — 181
Сергеева А.В. — 263
Сергеева А.Д. — 193
Серёгин Г.З. — 483
Середа Е.Е. — 31
Селиванова Д.С. — 144
Сивицкая Л.Н. — 157
Сивцев А.А. — 34
Сидоренко В.А. — 255
Сидоренко С.В. — 253, 470
Сидоренкова М.С. — 357, 360
Сидоров А.В. — 9
Сикамов К.В. — 107, 266
Силин А.Е. — 53
Симакова А.В. — 240
Синявская М.Г. — 157
Ситник Т.Н. — 15, 311
Скалин М.Д. — 128
Скачкова В.О. — 46
Скибина Ю.С. — 524
Скрябин Н.А. — 34
Слезина М.П. — 394
Слепцов А.А. — 436
Слизень В.В. — 165
Словарева О.Ю. — 400, 404
Смирнов И.П. — 266
Смирнов С.А. — 278
Смирнов С.Ю. — 41, 46, 50
Смирнова Л.Р. — 94
Смирнова Т.А. — 297
Смирнова Ю.Д. — 362
Смыр С.Р. — 97
Снежкина А.В. — 155
Снигирь Е.А. — 471
Снытков Е.В. — 363, 364
Соболев И.А. — 235
Соболева А.Г. — 62
Соболева Е.А. — 86
Соколова В.А. — 206
Солдаткин В.А. — 198
Солдатов Т.А. — 461
Соловьев А.И. — 297
Соломка В.С. — 118
Соловьева А.В. — 276
Соловьева Н.С. — 168
Солодилова М.А. — 215
Солодкий В.А. — 57
Солтынская И.В. — 333, 371, 381, 383
Сорокин Е.В. — 84, 89
Сорокина Е.Ю. — 222
Спивак В.В. — 401
Спирина Л.В. — 63
Спрыгин А.В. — 334
Ставицкая Н.В. — 167
Старкова Д.А. — 10
Старкова О.Г. — 461
Старкова П.А. — 169
Старостина Е.В. — 465
Старчевская М.Е. — 307
Шашкевич Д.С. — 223, 451
Шельмашок В.И. — 228, 283
Шепанов В.А. — 127, 128, 188, 217
Шепанова Т.В. — 354
Шепанова Т.Ф. — 462
Штеценко И.Ф. — 303, 469
Штоляр М.А. — 43, 59, 430, 442
Штражеско И.Д. — 476, 522
Штрижелецкий В.В. — 470
Штрелкова Д.А. — 258
Штукалова И.В. — 25
Штуколова О.А. — 313
Штучинская М.Д. — 320
Шуботинская А.И. — 67
Шубоч Е.И. — 41, 46, 50
Шуворов Д.И. — 61
Шудоргина Т.Е. — 352
Сулян О.С. — 470
Сульдина Е.В. — 380, 407
Сулин В.Л. — 144, 156
Суркова Л.К. — 165
Суслина О.В. — 289
Суслопаров И.М. — 467
Сулова Т.А. — 223, 451
Сухан Т.О. — 183
Сухер М.М. — 345
Сухина М.А. — 297
Сушовольский В.Г. — 59
Суханова Д.Д. — 495
Суходолова Т.А. — 213
Сучкова И.О. — 206
Сушенцева Н.Н. — 300
Сушко Л.М. — 155
Сыромятников М.Ю. — 362
Сыченкова Н.И. — 77
Сяхович В.Э. — 181
- Т**
Таева У.Е. — 472
Тазетдинов А.М. — 133
Танхаева А.И. — 162

Таранин А.В. — 450
Тараскина А.Н. — 470, 471
Тарасова Е.В. — 410
Тарасова Ж.Е. — 511
Тарасова И.В. — 522
Тартаковский И.С. — 125
Тахирова З.Р. — 133
Татаринов А.Е. — 206
Терентьева Д.Р. — 171, 178
Терехов М.В. — 470, 476
Терешкина Е.Б. — 484, 497, 519
Терлецкий В.П. — 342
Тикунова Н.В. — 309
Тиллиб С.В. — 77
Тиманов М.В. — 353
Тимашева Я.Р. — 225, 233
Тимерман А.Д. — 442
Тимина А.М. — 353
Тимофеева И.А. — 333, 381
Тимошичева Т.А. — 464
Титов Б.В. — 200
Титов В.В. — 520
Титов И.А. — 350
Титов Л.П. — 317
Титова С.В. — 114
Тихомиров Д.С. — 461
Тихомирова Ю.Р. — 423
Тихонович Э.Л. — 472
Тишкевич О.А. — 391
Тищенко А.А. — 513, 520
Ткачева О.Н. — 476, 522
Ткаченко Б.Э. — 197
Тойгильдин А.Л. — 407
Толмачева Е.Н. — 518
Толоконцева А.А. — 96, 103, 111, 359
Толькова Е.С. — 337
Тоннанг Момо С. — 210
Топольская С.В. — 159
Топузов Э.Э. — 21
Топчиева Л.В. — 212, 218
Тороповский А.Н. — 49
Тотменин А.В. — 343
Трегубова Е.В. — 47
Трифонова Е.А. — 217, 518
Трофимова С.В. — 508
Троценко О.А. — 94
Трушакова С.В. — 320
Трушина Ю.Н. — 242
Трякин А.А. — 73
Туктарова И.А. — 225, 233
Туполева Т.А. — 462
Туремуратова А.Б. — 312
Туркина В.А. — 35
Туякова Н.С. — 180
Тхоренко Б.А. — 173, 176, 220
Тыщенко В.И. — 346
Тюрин Ю.А. — 456
Тюрина Е.Б. — 170

У

Уварова М.А. — 454
Угрюмов М.В. — 478
Уланова П.В. — 271
Ульянова М.В. — 220
Уляшова М.М. — 260
Умуралиев Б.К. — 368
Уразаева Д.Р. — 266
Усикова Л.А. — 453
Уткин О.В. — 86

Ф

Фаворова О.О. — 194, 200
Фадеев А.В. — 318
Фатхудинов Т.Х. — 62, 505
Фахрадиев И.Р. — 180
Фёдорова А.В. — 270
Федорова В.А. — 101, 320
Федорова Е.С. — 17
Федорова И.К. — 34
Федорова М.С. — 155
Федотова Е.Ю. — 151, 190
Федуленко Д.А. — 284
Федянин М.Ю. — 73
Феоктистова Н.А. — 110, 380, 407
Филатов П.В. — 117, 262
Филатова Е.Н. — 86
Филиппова А.А. — 260
Филиппова А.Н. — 208
Филиппова Е.А. — 29, 44, 47
Филиппова М.А. — 118, 429
Филиппова Ю.Ю. — 482
Фирова Э.М. — 206
Флеер М.В. — 343
Флорен А.М. — 89
Флоринская В.С. — 513, 520
Фокина Е.С. — 47
Фомина О.В. — 309, 486
Фомина Т.А. — 373
Фомкин Р.Н. — 203
Фонова Е.А. — 518
Фридман М.В. — 69, 71
Фролова И.Н. — 270
Фурсова Н.К. — 260

Х

Хабаров О.Р. — 466
Хабибуллин Н.Р. — 272, 274
Хавинсон В.Х. — 508
Хаджиева М.Б. — 468
Хадиева Е.Д. — 245
Хайретдинова Э.Б. — 79
Хакимов Н.М. — 456
Хальчицкий С.Е. — 208
Харьков В.Н. — 127, 128
Хасанова Р.Р. — 240
Хахина А.О. — 68
Хвостов Д.В. — 370
Хвостова Е.П. — 453

Хегай Т.Р. — 13, 152, 457
 Хидишан И.В. — 19, 33
 Хлебникова М.А. — 288
 Ходоронок Е.И. — 75, 185, 230
 Хожовец М.В. — 46
 Хозяинова А.А. — 235
 Холод Н.С. — 345
 Холодилов И.С. — 244, 247
 Холодкова Е.И. — 299
 Холодов А.А. — 173
 Холопов Д.В. — 21
 Хоров А.О. — 75, 185, 230
 Хорохорина В.А. — 197
 Хотелева Л.В. — 159
 Хрипач Л.В. — 523
 Хромова Е.Б. — 223
 Хрульнова С.А. — 270, 272, 274
 Хуснутдинова Н.Н. — 227
 Хуснутдинова Э.К. — 28, 133

Ц

Царева Т.Р. — 89
 Царёва Т.Р. — 84
 Цветкова И.А. — 470
 Цветкова Н.А. — 85
 Цепенко В.В. — 38
 Цыпкина А.В. — 469
 Цыганова Г.М. — 315

Ч

Чакова Н.Н. — 141, 142
 Чалый З.А. — 378
 Чвала И.А. — 323, 325, 326, 330, 331, 334
 Чекалин А.М. — 407
 Чепрасов М.Ю. — 316
 Чердынцева Н.В. — 55
 Черемисина О.В. — 31
 Черемных Е.Г. — 519
 Черемных Н.В. — 86
 Черенкова Г.Ю. — 470
 Черкасов Н.Н. — 162
 Черкашина Е.В. — 14
 Черневская М.В. — 186
 Черневская О.М. — 275
 Черненко И.Н. — 435
 Чернецкая Д.М. — 156
 Чернуха М.Ю. — 276
 Чернышев Р.С. — 341, 357, 360
 Чернышов Н.А. — 240
 Черняева Е.Н. — 68, 174, 469
 Черняк С.В. — 186
 Черткова Е.П. — 236
 Чеснокова Н.Б. — 478
 Чикаев Н.А. — 450
 Чойнзонов Е.Ц. — 31
 Чудайкина Н.Н. — 159
 Чудинов А.В. — 429
 Чулкова П.С. — 253, 470
 Чумак А.А. — 288

Ш

Шабалина А.А. — 190
 Шабалина А.В. — 257, 431
 Шабалина А.Э. — 514
 Шабанов П.Д. — 495
 Шабанова Е.С. — 156
 Шадрунова В.В. — 221
 Шайхразиева Н.Д. — 456
 Шалина К.А. — 334
 Шамаева С.А. — 184
 Шамсутдинова О.А. — 14
 Шанский Я.Д. — 376, 384, 483, 509
 Шаньшин Д. В. — 246
 Шаповалова В.В. — 253, 273
 Шараметдинов Х.Х. — 222
 Шарашкина Н.В. — 522
 Шагабиева Ю.З. — 118
 Шаршов К.А. — 235
 Шаскольский Б.Л. — 118, 429
 Шафорост А.С. — 94, 294
 Шахгильдян В.И. — 391
 Шахова К.А. — 423
 Шварц Я.Ш. — 167
 Шевченко А.И. — 291
 Шевченко Н.И. — 24
 Шевчук Д.В. — 474
 Шевырев Д.В. — 512
 Шевякова Е.А. — 83, 445
 Шейко Р.И. — 363, 364, 366
 Шелли Е.М. — 522
 Шемшура А.Б. — 159
 Шемшура Т.А. — 159
 Шепелева О.А. — 337
 Шепетько М.Н. — 36
 Шестопалов А.М. — 235
 Шешенин В.С. — 497, 519
 Шибекко О.В. — 183
 Шиманский В.С. — 300
 Шинкаркина А.П. — 38
 Шиповалов А.В. — 465
 Шиповская А.А. — 212
 Шипулин А.В. — 418
 Шипулин Г.А. — 65, 68, 96, 103, 111, 174, 175, 252, 253, 254, 258, 273, 279, 293, 303, 315, 359, 469, 498, 503, 511
 Шипулина О.Ю. — 90, 92
 Шипунов М.В. — 67
 Широкова И.Ю. — 253
 Ширишиков Ф.В. — 505
 Шитиков Е.А. — 179, 265, 277
 Шкоденко Л.А. — 437
 Шкурат М.А. — 224, 449
 Шкурат Т.П. — 193, 450
 Шлык И.В. — 470
 Шлыкова А.В. — 159
 Шматов Ф.М. — 174
 Шмелькова Д.М. — 223
 Шмитко А.О. — 295
 Шнейдер Ю.А. — 403

Шошина Е.А. — 472
Шотин А.Р. — 344
Шпилюкова Ю.А. — 151, 190, 475
Штонда М.В. — 192
Шубина Ю.Ф. — 286
Шуйтасова Л.М. — 121
Шулунов А.А. — 162
Шурпач С.Л. — 206
Шурубор Е.И. — 479, 490, 499
Шуряева А.К. — 96, 103, 111, 359

Щ

Щаюк А.Н. — 36
Щемелева Е.Ю. — 144
Щелочков А.М. — 145
Щеголева А.А. — 55
Щербак С.Г. — 300
Щербаков Д.Н. — 237, 246, 450
Щербакова Л.А. — 394
Щербакова Л.О. — 326
Щербинин Д.Н. — 297
Щукина А.А. — 495
Щучинов Л.В. — 236
Щучинова Л.Д. — 236

Э

Эйдельштейн И.А. — 122, 123
Эрдман В.В. — 225, 233
Эсмедляева Д.С. — 165, 172

Ю

Юдин В.С. — 470, 471, 476, 479, 490, 499, 522
Юдин С.М. — 470, 471, 476, 522
Юдина Н.А. — 204
Юдкин Д.В. — 521
Юнусбаев Б.Б. — 171
Юнусбаева М.М. — 171
Юренева С.В. — 505
Юсупова Е.П. — 255
Юшков Б.Г. — 22

Я

Яблонский П.К. — 165
Ядрихинская М.С. — 391
Яковлев А.А. — 81
Яковлев И.М. — 121, 309
Яковлева Е.В. — 156
Яковлева Н.А. — 236
Яковчик А.Ю. — 476
Яковчиц Н.В. — 242
Якубовский С.В. — 69, 71
Янковская А.А. — 402
Янович О.О. — 317
Ярема П.О. — 35
Яремко А.Б. — 394, 404, 406
Яровая Е.Б. — 391
Ярославцева П.С. — 331
Яцентюк С.П. — 327, 329, 339, 372

XI МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА»

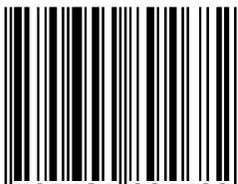
СБОРНИК ТРУДОВ

ПЛАТИНОВЫЙ ПАРТНЁР: ООО «ИНТЕРЛАБСЕРВИС»

АО «САЙЕНС МЕДИА ПРОДЖЕКТС»
129085, Г. МОСКВА, ВН.ТЕР.Г. МУНИЦИПАЛЬНЫЙ ОКРУГ ОСТАНКИНСКИЙ,
ГОДОВИКОВА УЛ., Д. 9, СТР. 9, ЭТАЖ 2, ПОМ./КОМ. 1/5.

Сдано в набор 26.10.2023. Подписано в печать 27.10.2023
Гарнитура Myriad Pro. Формат 60х90/8
Печать офсетная. Усл. печ. л. 72
Тираж 300 экз. Заказ No 200091

ISBN 978-5-6048946-8-2



9 785604 894682