

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ**

**«РОСТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Молодежное научное общество

Кафедра общей и клинической биохимии № 2

Кафедра химии подготовительного факультета по обучению иностранных граждан



РОСТОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



МНО

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, ХИМИЯ И МЕДИЦИНА

*Материалы V внутривузовской межкафедральной
научно-практической конференции
студентов и молодых ученых*

**Ростов-на-Дону
17 мая 2021**

УДК 577.1 (063)
ББК 28.070
М - 75

Молекулярная биология, химия и медицина: материалы V внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, 17 мая 2021 г. / отв. ред. Т.А. Шустанова; ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ, 2021. – 27 с.

В сборнике представлены результаты информационно-аналитической и научной работы по фундаментальным и прикладным исследованиям в области молекулярной биологии, химии и медицины, перспективным методам генодиагностики и генотерапии, используемым в современных клинических лабораториях.

Члены организационного комитета конференции:

Добаева Н.М. – к.х.н., доцент, зав. каф. общей и клинической биохимии №2
Шустанова Т.А. – к.б.н., доцент каф. общей и клинической биохимии № 2
Грекова Г.А. – к.б.н., доцент, зав. каф. химии подготовительного факультета по обучению иностранных граждан

Редакционная коллегия:

Шустанова Т.А. – ответственный редактор
Редакторы: Добаева Н.М., Грекова Г.А.

Статьи опубликованы в авторской редакции

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ В ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ ОНКОТЕРАПИИ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Сопов А.А., Шустанова Т.А.

*ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет»
Минздрава России, кафедра общей и клинической биохимии №2,
e-mail: transerfing58@mail.ru*

Ключевые слова: противоопухолевые препараты, онкологические заболевания, адъювантная терапия, таргетная терапия

Злокачественные новообразования являются одними из самых тяжёлых и малоизученных заболеваний в настоящее время, так как раковые клетки отличаются большой степенью дифференцировки и неконтролируемым размножением. В связи с этим первостепенной важной задачей современной медицины является разработка лекарственных средств, способных подавлять опухолевые процессы.

Целью нашей работы явилось изучение статистики раковых заболеваний у разных групп населения России и Ростовской области за 2019 год, наиболее встречающихся форм злокачественных новообразований, процент выживаемости на разных этапах болезни, а также сравнительный анализ эффективности некоторых противоопухолевых препаратов.

Исследование проводилось на базе Онкологического центра РНИОИ и по данным литературы. Объём выборки составил 75 человек, из которых: 20% (15 человек) приехали из области для постановки на учёт, 80% (60 человек) составляли местные жители, проходившие лечение: около 1% (6 человек) составляли дети с лейкозом разной степени тяжести заболевания, 30% (18 человек) - работоспособного населения с различными заболеваниями: раком лёгких, кожи, молочной железы, 69% (36 человек) — нетрудоспособное население (65-70 лет) также с различными типами злокачественных заболеваний. В общем, по Ростовской области в 2018-2019 году было выявлено 150 тысяч случаев заболевания раком, при этом 57% человек стояли на учете, 15 тысяч впервые встали на учёт.

В 2019-2020 году в России было выявлено около 640 тысяч заболевших, из них 54% составляли женщины, 46% - мужчины, в том числе 3500 дети. У женщин диагностированы опухоли молочной железы (20%), кожи (16%), матки (7%). У мужчин рак лёгких (20%), кожи (11,5%) и простаты (11%). У детей 5-7 лет наиболее часто встречаются лейкозы, гемобластозы, а также опухоли головного и спинного мозга [1]. Как и по всей стране, в Ростовской области преобладают следующие типы рака: молочной железы, кожи, лёгких, тела матки, простаты.

Трудности диагностики опухолей связаны с редкостью данных

заболеваний и особенностями их клинического течения, так как опухоли имеют «скрытую локацию», существует множество «заболеваний-масок», под которыми скрывается проявление злокачественных образований. Основу лечения составляет полихимиотерапия, направленная на полное уничтожение лейкозного клона. Рассмотрим молекулярные механизмы действия наиболее распространённых противоопухолевых препаратов.

Алкилирующие антинеопластические препараты - производные бис-В-хлорэтиламина - цитостатические противоопухолевые средства, производные нитрозомочевины и препараты, содержащие двухвалентную платину. Механизм их действия основан на внедрении алкильной группы препарата в ДНК раковой клетки, что приводит к нарушению структуры ДНК, остановке деления и запуску апоптоза. Алкилирующие триазины - пролекарства, превращаются в ходе метаболизма в организме в метилирующие агенты, которые внедряясь в ДНК и РНК раковой клетки, нарушают её деление. Антиметаболиты – вещества, вызывающие апоптоз, путём конкурентного вмешательства в процесс деления клетки. Антрациклиновые антибиотики - препараты цитотоксического действия, направленные на ингибирование синтеза ДНК, нарушение проницаемости клеточных мембран и угнетение других механизмов жизнедеятельности клеток. Ингибиторы топоизомераз I и II, ингибиторы образования микротубул и веретена деления - цитостатические препараты, избирательно нарушающие структуру ДНК и деление раковых клеток на разных этапах клеточного цикла [2].

Химиопрепараты в большинстве случаев вводятся внутривенно или перорально, тогда они оказывают системное воздействие на весь организм, либо местно во время хирургической операции для обработки операционного поля, или регионарно, в желудочки головного мозга. Наряду с химиотерапией проводится активная и пассивная иммунотерапия: введение лейкозных клеток, вакцины БЦЖ. Перспективными методами также являются трансплантация костного мозга, стволовых клеток. Процент выживаемости детей при лейкозе, если заболевание было выявлено на непоздней стадии, составляет 60-80%. В случае с злокачественными заболеваниями лёгких, применяют таргетную терапию с использованием препаратов Винорелбин, цисплатин или гемцитабин. Сочетание таких препаратов у 40-60% больных дает общий эффект, полный эффект 2,3%, стабилизация процесса составляет 22,7%. Для лечения опухолей молочной железы применяют адъювантное лечение с эффективностью 80-90%. В зависимости от молекулярно-биологического типа рака применяются разные типы адъювантной терапии: люминальный подтип А – гормонотерапия – тамоксифен + анаэстрозол (или летрозол) или эксеместан + гозерелин. Люминальный подтип В (HER2 положительный): гормонотерапия + доцетаксел (или паклитаксел, или карбоплатин) + трастузумаб. Нелюминальный подтип (HER2 положительный): доксорубин + циклофосфамид + трастузумаб. Тройной негативный (протоковый): доксорубин + циклофосфамид.

Таким образом, нашей перспективной задачей является дальнейшее изучение молекулярных механизмов действия, разработка и применение новейших эффективных противоопухолевых препаратов для лечения больных без риска рецидива.

Список литературы

1. Романов Б.К., Дмитриева Н.Б., Зацепилова Т.А. Противоопухолевые препараты // Российский медицинский журнал. 2018. - Т.24, №3. - С.150-158.
2. Михаленко Е.П., Щаюк А.Н., Кильчевский А.В. Сигнальные пути: механизм регуляции пролиферации и выживаемости опухолевых клеток // Молекулярная и прикладная генетика. 2019. - Т.26. - С.145-157.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА Т-КЛЕТОК. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Рубанова В.Н., Шустанова Т.А.

*ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет»
Минздрава России, кафедра общей и клинической биохимии №2*

Ключевые слова: Т-клеточные рецепторы, онкотерапия, биотехнология

В основу большей части методов терапии в онкологии положен принцип воздействия на саму опухоль, учитывая отличия опухолевых клеток от здоровых, что предполагает минимизацию негативного влияния онкотерапии на нормальные ткани организма, достигая при этом максимального эффекта в отношении только опухоли.

В данной области одним из интенсивно и успешно развивающихся направлений считается адаптивная иммунотерапия, в частности технология использования химерных Т-клеточных рецепторов (chimeric antigen receptor, CAR T-cells), направленных против опухолевых антигенов. CAR T-терапия – новый прогрессивный метод адаптивной иммунотерапии злокачественных опухолей, основанный на генетической модификации клеток Т-лимфоцитов, собранных из периферической крови с помощью лейкоцитафереза, в целях приобретения ими противоопухолевых свойств с последующей реинфузией пациенту. Основное преимущество CAR T-терапии по сравнению с другими технологиями онкотерапии заключается в том, что для распознавания клеток-мишеней Т-лимфоцитам не нужно присутствие молекул главного комплекса гистосовместимости 1-го класса (МНС-I). На основании клинических исследований было доказано преимущество CAR T-терапии в сравнении с другими методами лечения, применяющимися в данной области, и на

сегодняшний день данный метод является одним из перспективных способов воздействия на злокачественную опухоль.

Цель работы: изучение механизмов CAR T-терапии и биотехнологии получения модифицированных клеток, а также анализ побочных эффектов данных методов.

Адаптивная иммунотерапия технологией CAR T-cells. Известно, что цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты являются главным эффекторным звеном в адаптивном иммунном ответе на АПК. Для цитотоксического действия CD8⁺ Т-лимфоцитов необходимо наличие на поверхности лизируемых клеток молекул главного комплекса гистосовместимости, продукция которых снижена при большинстве злокачественных опухолей. Этот недостаток устраняет терапия модифицированными Т-лимфоцитами, имеющие химерные Т-клеточные рецепторы. Для распознавания клеток-мишеней получаемые Т-лимфоциты не нуждаются в присутствии молекул МНС I класса на АПК, при этом запускаются те же механизмы активации и цитотоксичности, что и при связывании с мишенью обычного Т-клеточного рецептора. Однако применение химерных антигенных рецепторов возможно только против поверхностных опухолевых антигенов, так как распознавание клеток-мишеней, не связанных с МНС-I, делает невозможным использование в качестве целевого антигена химерного рецептора внутриклеточных антигенов.

Строение CAR Т-лимфоцита. Химерный антигенный рецептор представлен следующими компонентами: внеклеточным доменом — одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела; шарнирным участком; трансмембранным доменом; внутриклеточным сигнальным доменом — состоит из ζ-цепи маркера CD3 и дополнительных молекул. Активация Т-клеток происходит в процессе передачи сигнала от внеклеточного домена, распознающий опухоль-ассоциированный антиген, через трансмембранный домен на внутриклеточный. Такая структура CAR позволяет Т-лимфоцитам специфически реагировать на опухолевые клетки с конкретными антигенами.

Существует четыре поколения химерных рецепторов. Их основное отличие заключается в структуре внутриклеточного домена. Конструкция внутриклеточного домена химерных рецепторов такова: 1-е поколение — состоит только из ζ-цепи CD3; 2-е поколение — включает мономолекулярные рецепторы, содержащие один костимулирующий домен; 3-е поколение — включает мономолекулярные рецепторы, содержащие более одного дополнительного костимулирующего домена, например CD27, CD28, CD134, CD137; 4-е поколение — CAR Т-клетки были получены путем добавления доменов, кодирующих иммуностимулирующие цитокины — интерлейкины (IL-2, IL-12, IL-8, IL-15, IL-18). Их добавление к основанию конструкций 2-го поколения позволяет увеличить экспансию CAR Т-клеток, в то же время делая их устойчивыми к иммуносупрессивной среде опухоли.

Технология получения CAR Т-лимфоцита. Существует два возможных способа получения CAR Т-клеток: *in vivo* и *ex vivo*. Суть первого способа заключается в том, что в кровь пациента вводятся наночастицы, которые

превращают Т-лимфоциты пациента в CAR Т-клетки. Метод *ex vivo* предполагает производство CAR Т-клеток из нескольких этапов. 1. Сбор Т-клеток из периферической крови с помощью лейкоцитозифереза. 2. Активация Т-клеток и трансдукция вирусными (ретровирусными или лентивирусными) или невирусными векторами генов загрузки CAR. 3. Культивирование модифицированных Т-клеток до необходимой дозы. 4. Контроль продукта: отслеживается качество и стерильность клеток, проводится тестирование на микробиологическую безопасность и функциональную активность Т-лимфоцитов. 5. Готовый клеточный продукт вводится пациенту или криоконсервируется.

Клинические исследования CAR Т-клеток показали высокую эффективность при онкогематологических заболеваниях, включая острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) и неходжкинские лимфомы (НХЛ). Показана активность CAR Т-клеток у пациентов со множественной миеломой. Терапия может быть направлена и на такие заболевания, как немелкоклеточный рак легкого, нейробластома, глиома, рак простаты, мезотелиома, остеосаркома, рак шейки матки, желудочно-кишечные стромальные опухоли, рак яичников, опухоли брюшины, глиобластома, метастатический печеночноклеточный рак, аденокарцинома поджелудочной железы.

В настоящее время ряд фармацевтических компаний мира Novartis, Gilead производят препараты для CAR Т-терапии под торговым названием Кимрайа (Kymriah). Курс лечения данным препаратом показала 72-83%-ю частоту ремиссии у пациентов, которые не реагировали на стандартные методы лечения. При этом у 49% пациентов отмечались выраженные проявления синдрома цитокинового шторма, что привело к нескольким летальным исходам на этапе клинических исследований.

Побочные эффекты и проблемы технологии. В клинических исследованиях CAR Т-клеток был выявлен ряд побочных эффектов. К наиболее распространенным относятся: В-лимфопения; аллергические реакции; синдром лизиса опухоли; синдром цитокинового шторма (СЦШ); нейротоксичность.

СЦШ – наиболее тяжелый побочный эффект терапии CAR Т-клетками, описанный всеми крупными исследовательскими группами. СЦШ является потенциально жизнеугрожающим состоянием, сопровождающим терапевтическое введение как моноклональных и биспецифических антител, так и Т-клеток, экспрессирующих CAR. В основе СЦШ лежит системный воспалительный ответ, обусловленный гиперпродукцией провоспалительных цитокинов. Источником цитокинов являются как собственно CAR Т-клетки, так и вторичные эффекторы. Тяжесть течения СЦШ варьирует и может достигать полиорганной недостаточности и летального исхода.

В целом CAR Т-терапия является успешным на сегодняшний день методом борьбы с онкозаболеваниями, и данное направление активно развивается. Основная цель в области CAR-T – разработка аллогенной CAR Т-терапии, т.е. получение Т-клеток у здоровых доноров и их заготовка, чтобы

не прибегать к индивидуальной разработке аутологичных Т-клеток у каждого конкретного пациента, а использовать уже готовые к использованию по показаниям модифицированные Т-клетки. Такой подход позволит внедрить и широко применять CAR Т-терапию в условиях реальной клинической практики. Имеются определенные сложности в применении этого вида лечения. В частности, биотехнология CAR-T требует высоких материальных, интеллектуальных и организационных ресурсов, что предполагает их возможную реализацию лишь в крупных научных центрах. Главные проблемы заключаются в том, как повысить эффективность и устойчивость вводимых клеток и уменьшить неблагоприятные последствия лечения.

Таким образом, CAR Т-клеточная терапия позволяет достигать значительных успехов в борьбе с гематологическими злокачественными опухолями. Однако данная технология недостаточна оснащена необходимыми ресурсами для ее широкого развития и распространения. Требуется повышение как эффективности, так и безопасности применения CAR Т-клеток. Несмотря на новые возможности лечения пациентов с онкологическими заболеваниями с использованием CAR Т-клеточной терапии, частота достижения ответа ограничена, а появление рецидивов не редко. В терапии солидных опухолей успехи менее впечатляющие, чем в онкогематологии, что связано с особенностями биологии солидных опухолей и нерешенными вопросами стимулирования инфильтрации и персистирования CAR Т-клеток в опухолевом микроокружении. Адаптивная иммунотерапия с использованием генно-модифицированных Т-лимфоцитов стала прорывным направлением в медицине, в онкологии в частности, что позволяет бороться с опухолями более эффективно и успешно.

Список литературы

1. Павлова В.Ю., Ливадный Е.С. Биотехнология CAR-T и новые возможности лечения опухолевых заболеваний // Клиническая онкогематология, 2021. - № 1.
2. Кувшинов А. Ю., Волошин С. В., Кузяева А. А., Шуваев В. А., Михалева М. А., Мартынкевич И. С., Четкин А. В., Бессмельцев С. С. Современные представления о CAR Т-клеточной терапии // Вестник гематологии, - 2019. - №2.
3. Киселевский М.В., Чикилева И.О., Ситдикова С.М., Власенко Р.Я., Караулов А.В. Перспективы применения генетически модифицированных лимфоцитов с химерным Т-клеточным рецептором (CAR-T-клеток) для терапии солидных опухолей // Иммунология, 2019. - №4.
4. Павлова А.А., Масчан А.Б. // Адаптивная иммунотерапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы // Общая гематология, 2017. - №1.
5. Казарновский М.Д. // Адаптивная Т-клеточная терапия. Электронный ресурс (презентация с конференции).

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СТРЕССА

Шатов А.Ю., Шестакова Т.Е.

*Кафедра общей и клинической биохимии №2 РостГМУ МЗ России,
Ростов-на-Дону*

Аннотация: в статье рассматривается влияние стресса на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось и дальнейшее действие гормонов на биохимические процессы организма.

Стрессорные факторы, действующие на организм, вызывают в нем цепь защитно-приспособительных реакций, заключающихся в изменении нервных, гормональных, метаболических и физиологических процессов [1].

Действие стрессора (стрессорного раздражителя) вызывает ОАС (общий адаптационный синдром). ОАС состоит, в свою очередь из трех стадий: стадии тревоги, стадии устойчивости и стадии истощения.

На стадии тревоги (фаза шока) развивается гипоксия, снижение артериального давления, гипотермия, гипогликемия, а организм оказывается подверженным повреждению и может погибнуть, если не включится механизм действия адаптивных гормонов. Во вторую фазу стадии тревоги (фаза противошока) происходит выработка гормонов гипоталамусом (рилизинг-факторы КРФ, СРФ, ТРФ), которые стимулируют выработку АКТГ, СТГ, ТТГ передней долей гипофиза. АКТГ стимулирует выработку катехоламинов и глюкокортикоидов надпочечниками; ТТГ – выработку йодтиронинов щитовидной железой и глюкагона в поджелудочной железе. Все вышеперечисленные гормоны вызывают повышение уровня глюкозы в крови, путем активации процессов глюконеогенеза и гликогенолиза, повышение артериального давления, повышение уровня свободных жирных кислот и триацилглицеринов в плазме [2].

Во вторую фазу ОАС, фазу устойчивости, наблюдается высокий уровень резистентности организма к стрессору. В стадию резистентности (устойчивости) усиливаются анаболические процессы: синтез белка, (пролиферация новых клеток), глюконеогенез (гипергликемия), липолиз и далее синтез ацетила-КоА, как источника АТФ в клетках; задержка воды и натрия в организме.

В случае продолжения действия стрессора возможно снижение резистентности организма вплоть до гибели.

Список литературы

1. Патофизиология нейроэндокринной системы: Уч. пособие / под ред. А. П. Ястребова. — Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2018. - 112 с.

2. Гуляева Н.В. Нейрохимия стресса: химия стресс-реактивности и чувствительности к стрессу // Нейрохимия. 2018. Т.35. № 2. С. 111-114.

МИКРО-РНК В ПАТОГЕНЕЗЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Ахмед Мохамед, Шустанова Т.А.

*ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет»
Минздрава России, кафедра общей и клинической биохимии №2*

Ключевые слова:

МикроРНК - малые не кодирующие молекулы РНК длиной 18-25 нуклеотидов, принимающие участие в транскрипционной и пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов путём РНК-интерференции.

Сигнальный путь JAK-STAT: цепочка взаимодействий между белками в клетке в процессах иммунитета, деления клеток, гибели клеток и образования опухоли.

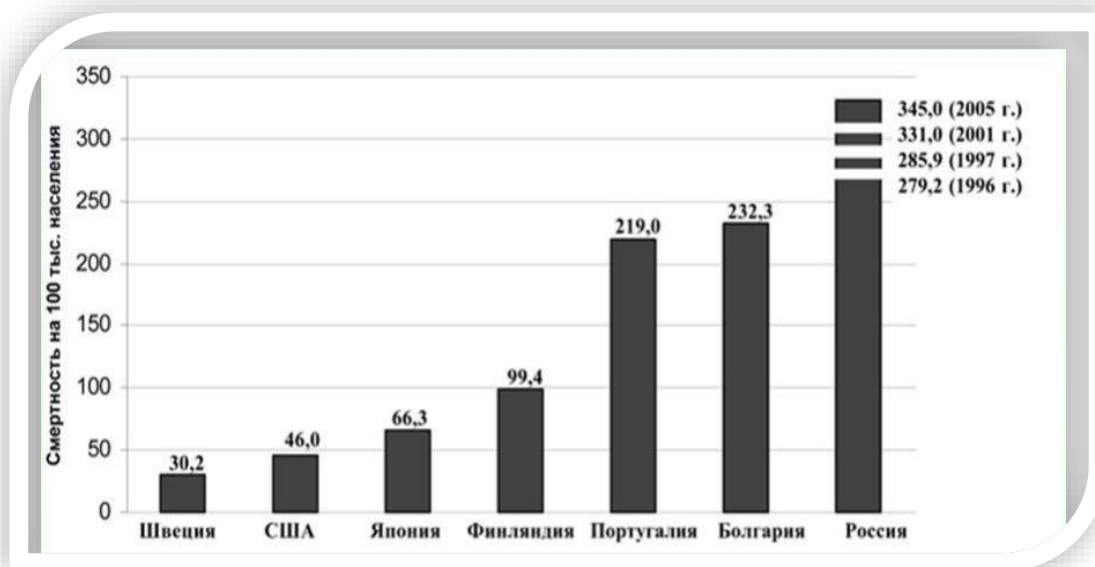
STAT3: сигнальный белок и активатор транскрипции.

JAK2 (Янус киназа 2): участвует в передаче сигналов членами семейства цитокиновых рецепторов типа II (например, рецепторов интерферона).

TNF-α (Фактор некроза опухоли): внеклеточный белок, многофункциональный провоспалительный цитокин, синтезирующийся в основном моноцитами и макрофагами.

Ишемический инсульт – это нарушение мозгового кровообращения с повреждением ткани мозга, нарушением его функций вследствие затруднения или прекращения поступления крови к тому или иному отделу. Может быть обусловлен недостаточностью кровоснабжения определённого участка головного мозга по причине снижения мозгового кровотока, тромбоза или эмболии, связанных с заболеваниями сосудов, сердца или крови.

Является одной из основных причин смертности среди людей. Заболеваемость и смертность населения мира в настоящее время показана на графике.



Факторы риска инсульта - атеросклероз и тромбообразование - наиболее распространённая патология церебральных и прецеребральных артерий, вызывающая ишемические нарушения мозгового кровообращения.



Независимо от причины, вызвавшей локальную ишемию мозга, развивается каскад патобиохимических изменений, приводящих к необратимому повреждению нервной ткани по механизмам некроза и апоптоза. Эта серия взаимосвязанных изменений получила название «патобиохимический каскад» или «ишемический каскад». **Целью работы** явилось исследование механизмов инсульта, а также изучение роли микроРНК в патогенезе ишемического инсульта.

Важнейшим механизмом запуска ишемического каскада является снижение мозгового кровотока с развитием дефицита кислорода, а, следовательно, и дефицита энергии.

Установлено, что микроРНК и их гены-мишени играют решающую роль в молекулярном патогенезе ишемического клеточного повреждения после инсульта, что важно в диагностике и терапии ишемического инсульта.

Оценена относительная сывороточная экспрессия miR-155, воспалительной микроРНК и мРНК (JAK2 / STAT3) у пациентов с острым ишемическим инсультом и ее связь с воспалительным цитокином TNF- α и различными факторами риска инсульта.



Результаты клинических исследований:

- циркулирующие miR-155, JAK2 / STAT3 значительно активированы среди пациентов с инсультом (в 4-8 раз, $P < 0,001$) со значительным увеличением TNF- α ($263,8 \pm 10,7$ пг / мл, $P < 0,001$).

- MiR-155, JAK2 / STAT3 положительно коррелировали с TNF- α . MiR-155, JAK2 / STAT3 были значительно увеличены у пациентов с инсультом и были связаны с такими факторами риска, как гипертония, атеросклероз сонных артерий и фибрилляция предсердий.

Выводы:

- повышенная экспрессия циркулирующих miR-155, JAK2 / STAT3 и TNF- α у пациентов с острым ишемическим инсультом может вызвать постинсультное клеточное воспаление.

- MiR-155 может быть использован в качестве потенциального воспалительного биомаркера острого ишемического инсульта.

Список литературы

1. Скоромец А.А., Яхно Н.Н. Нарушения кровообращения в головном и спинном мозге // Болезни нервной системы / Под редакцией Н. Н. Яхно, Д.Р.Штульмана. - М.: Медицина, 2018. - 120 с.
2. Сбойчаков В.Б. Тумор некротический фактор / Микробиология с основами эпидемиологии и методами микробиологических исследований // СПб.: СпецЛит, 2019. – 345 с.
3. Chen K., Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs // Nature Reviews Genetics. - 2017.- <https://doi.org/10.2147/IJGM.S295939>

ДЛИНА СТЕБЛЯ ДНК-ШПИЛЬКИ КАК ФАКТОР ЕЁ ОБРАЗОВАНИЯ. ММ РАСЧЁТЫ

Шатов А.Ю., Бачурин С.С.

Кафедра общей и клинической биохимии №2, ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону

Аннотация: в статье приводятся результаты ММ расчётов в силовых полях AMBER OL15 по относительной термодинамической стабильности линейной и шпильевой конформации фрагментов ДНК разной длины.

Вторичная структура ДНК *in vivo* не всё время представляет собой двойную спираль Уотсона и Крика [1, 2]. Во время работы генетического аппарата клетки (подготовки к синтезу белков или делению) двойная спираль ДНК расплетается. Участки одноцепочечной ДНК, в которых на противоположных концах оказываются комплементарные азотистые основания (аденин с тиминном, цитозин с гуанином), склонны к самосборке в неканоническую структуру ДНК – шпильку. ДНК-шпилька условно делится на две части: стебель, состоящий из комплементарно связанных

водородными связями азотистых оснований, и петля – участок, в котором проходит изгиб углеводно-фосфатного остова ДНК. Образование НС ДНК шпилька влияет на способность генетического аппарата клетки считывать необходимую информацию для синтеза белков. Однако вопрос о том, начиная с какой длины основания шпильки она становится термодинамически выгоднее, чем линейная форма ДНК, остается открытым.

В связи с тем, что экспериментальное исследование ДНК-шпилек достаточно трудоемко, отвечать на вопросы структурной биохимии удастся только с помощью методов вычислительной химии. Размеры системы, исчисляемые сотнями атомов, не позволяют использовать такие требовательные к ресурсам методы, как *ab initio* и DFT. На помощь приходят методы молекулярной механики (ММ), в которых многие соотношения (длины связей, валентные и двугранные углы, Ван-Дер Ваальсовы радиусы) между атомами рассчитываемой системы заданы в табличном виде.

Для приближения модели к условиям живой клетки, мы строили исследуемую систему следующим образом: конформер нуклеиновой кислоты (шпильевая или линейная форма), помещался в водяную ячейку (water box) таким образом, чтобы от каждого конца конформера до границы ячейки было расстояние не менее 8 Å, и добавляли ионы K⁺ для нейтрализации отрицательного заряда системы, обусловленного фосфатными группами нуклеиновых кислот. Такие системы были построены для каждого вида конформеров (линейная и шпильевая ДНК). Рассматривались молекулы ДНК, состоящие из следующего числа нуклеотидов: 15 (в стебле шпильки 6 уотсон-криковских пар), 13(5), ..., 7(2), 5(1). Расчёты проводились методами ММ с использованием силовых полей AMBER OL15 [3]. Энергия стабилизации ДНК-шпильки рассчитывалась как разность между энергией шпильки и энергией линейной формы ДНК: $\Delta E = E_{\text{hairpin}} - E_{\text{line}}$

Результаты расчётов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Энергия стабилизации ДНК-шпилек.
N_{у-к} – количество уотсон-криковских пар в стебле ДНК-шпильки

N нукл.	N _{у-к}	ΔE (ккал/моль)
5	1	- 5.9
7	2	- 6.1
9	3	89.22
11	4	121.86
13	5	154.5
15	6	187.5

Первые два результата с большей стабильностью линейной формы над шпильевой объясняются тем, что при оптимизации короткая линейная форма нашла более выгодный локальный минимум, чем изомерная ДНК-шпилька. ДНК-шпильки, начиная с основания из 3-х нуклеотидных пар, имеют

большую энергию стабилизации, чем линейная форма, так как помимо образования водородных связей, большую роль в стабилизации шпильки играет стэкинг-взаимодействие между соседними нуклеотидными парами.

Результаты работы позволяют говорить о том, что скорее всего к самосборке в ДНК-шпильку склонны фрагменты ДНК, на концах которых не менее трёх пар нуклеотидов комплементарны друг-другу. Результаты ММ расчётов необходимо рассматривать только как качественные результаты, так как методы ММ не способны вычислять заряды на атомах, что приводит к систематической ошибке при расчете абсолютных значений энергии системы. Более точные результаты могут быть получены при использовании гибридных QM/MM методов с учетом PCM эффектов водной среды (SAS модель).

Список литературы

1. A. Brunelle. DNA Structures: Unusual But Not Exceptional. Nat Biotechnol. 1988; 6:1307. doi:10.1038/nbt1188-1307a
2. N. Saini, Y. Zhang, K. Usdin, K.S. Lobachev. When secondary comes first--the importance of non-canonical DNA structures. Biochimie. 2013;95(2):117-23. doi: 10.1016/j.biochi.2012.10.005
3. R. Galindo-Murillo, J.C. Robertson, M. Zgarbová, J. Šponer, M. Otyepka, P. Jurečka, T.E. Cheatham. Assessing the Current State of Amber Force Field Modifications for DNA. J. Chem. Theory and Comput. 2016;12(8):4114–4127. doi:10.1021/acs.jctc.6b00186

СТРОЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ Cu(II) НА ОСНОВЕ БИС-ГЕТАРИЛГИДРАЗОНОВ 2,6-ДИАЦЕТИЛПИРИДИНА

Абляимова А.И., Туполова Ю.П., Попов Л.Д., Щербаков И.Н., Лидер Е.В., Лазаренко В.А., Четверикова В.А., Иванникова Е.В.

Кафедра физической и коллоидной химии химического факультета ЮФУ, г. Ростов-на-Дону; кафедра неорганической химии НГУ, г. Новосибирск; Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва; кафедра общей и клинической биохимии №2 РостГМУ МЗ России, Ростов-на-Дону

Аннотация: в статье рассматривается строение комплексов с солями Cu(II) на основе бис-гетарилгидразонов 1 и 2 – продуктов конденсации 2,6-диацетилпиридина с 2 – гидразинохинолином и 2-гидразино-4,6-диметилпиримидином изученное методами ЯМР ¹H-, ИК-спектроскопии и РСА.

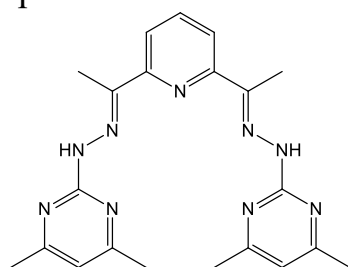
Биоорганическая химия – область исследований, которая приобретает все большее значение в современной медицине в связи с актуальностью

разработки средств для лечения онкологических заболеваний [1]. Для лечения рака в настоящее время используют препараты на основе комплексов платины(II) такие как цисплатин, карбоплатин и недаплатин, однако они имеют ряд побочных эффектов. Поэтому активно ведётся работа по получению противоопухолевых веществ, проявляющих меньшую токсичность [2]. Перспективными соединениями в этой области являются металлохелаты на основе гидразонов [3]. Причем было доказано, что комплексообразование часто приводит к увеличению противоопухолевых свойств [4].

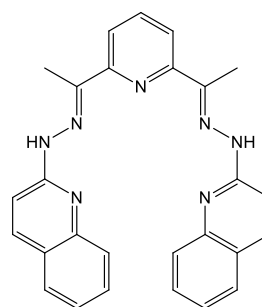
Цель работы: изучить строение комплексов с солями Cu(II) на основе бис-гетарилгидразонов 2,6-диацетилпиридина методами ЯМР ^1H -, ИК-спектроскопии и РСА.

Нами были получены комплексы с различными солями Cu(II) на основе бис-гетарилгидразонов 1 и 2 – продуктов конденсации 2,6-диацетилпиридина с 2 – гидразиноквинолином и 2-гидразино-4,6-диметилпиримидином соответственно и исследована их цитостатическая активность [5].

Строение полученных соединений установлено методами ЯМР ^1H -, ИК-спектроскопии и РСА.



1
(H_2L^1)



2
(H_2L^2)

Результаты исследования показали, что при взаимодействии бис-гетарилгидразонов 1 и 2 с CuX_2 ($\text{X} = \text{ClO}_4^-$, Cl^- , NO_3^- , Br^-) образуются комплексы различного состава и строения. На основе бис-пиримидилгидразона 1 образуются металлохелаты состава 1:1 (металл : лиганд) общей формулой $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^1)\text{X}]^+ \text{X}^-$ типа 3. Строение комплекса 3 на основе бромиды Cu(II) показано на рисунке 1.

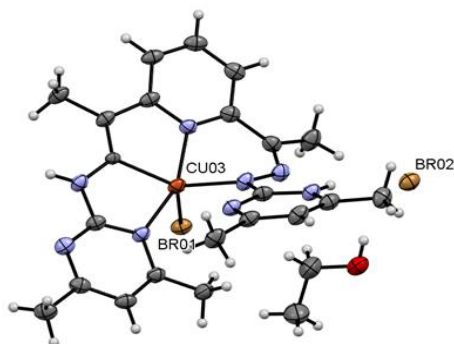


Рис.1. Строение комплекса 3 $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^1)\text{Br}]^+ \text{Br}^-$

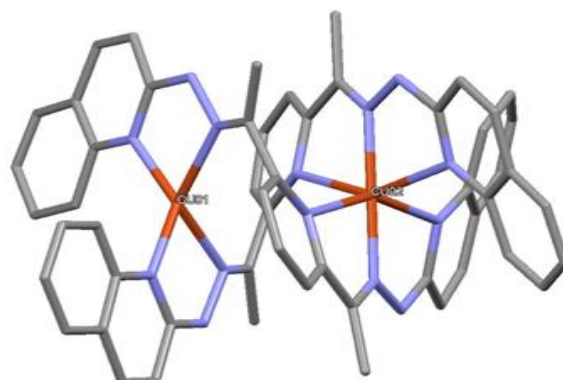


Рис. 2 Строение катиона комплекса $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{L}^2)_2]^{4+} \cdot 4\text{NO}_3^-$

Бис-пиримидилгидразон в комплексе 3 ведет себя как четырехдентатный NNNN-донорный лиганд в нейтральной форме и имеет несимметричное строение. Одной частью гидразонного фрагмента он координирует к иону меди через атомы азота азометинового и пиримидинового фрагментов, в другой же части лиганда в координации участвует только атом азота гидразонной группировки, при этом протон располагается на атоме азота пиримидинового фрагмента. Таким образом, координационный узел комплекса 3 представляет собой искаженную квадратную пирамиду в основании которой лежат атомы азота *бис*-гетарилгидразона, а в вершине располагается бромид-анион.

Комплексы Cu(II) типа 4 на основе бисхинолилгидразона 1 имеют состав 2:2 (металл : лиганд) и отвечают общей формуле $Cu_2(H_2L^2)_2]^{4+} \cdot 4X^-$ (рисунок 2). Из рисунка видно, что две молекулы *бис*гетарилгидразона в комплексе находятся в пентадентатной нейтральной форме. Каждая молекула координируется к иону меди Cu01 пиридиновым атомом азота, а также атомами азота азометинового и хинолинового фрагментов одной из гидразоновых частей лиганда, обуславливая, таким образом, октаэдрическое строение координационного узла. Оставшиеся гидразоновые группировки от двух молекул лиганда координируются к иону Cu02 через атомы азота азометинового и хинолинового фрагмента, создавая тем самым квадратное NNNN-донорное окружение.

Список литературы

1. Peter J. Sadler, Using coordination chemistry to design new medicines // Coordination Chemistry Reviews. 2007. V. 251. P. 1635-1638.
2. Luca Ronconi, Peter J. Sadler, Using coordination chemistry to design new medicines // Coordination Chemistry Reviews. - 2007. -vol. 251. - P. 1635-1638.
3. Lakshmi Narayana Suvarapu [текст] / Young Kyo Seo, Sung Ok Baek, Varada Reddy Ammireddy, Review on Analytical and Biological applications of Hydrazones and their Metal Complexes // E-Journal of Chemistry. – 2012. vol. 9. № 3. - P. 1288-1304
4. D.S. Raja, N.S.P. Bhuvanesh, K. Natarajan // European Journal of Medicinal Chemistry. 2012. V.47. P.73
5. Туполова Ю.П. и др. Цитостатическая активность комплексов Cu(II) с бисгетарилгидразонами 2,6-диацетилпиридина // Молекулярная биология, химия и медицина: материалы IV внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, Ростов-на-Дону, РостГМУ, 2020. С.26-28.

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПЕРВОЙ И ВТОРОЙ ЛИНИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У ПОДРОСТКОВ С РАЗНЫМИ ФОРМАМИ ВЕГЕТО-СОСУДИСТОЙ ДИСТОНИИ

*Кафедра химии подготовительного факультета по обучению
иностранных граждан РостГМУ МЗ России, Ростов-на-Дону*

Аннотация: в статье рассматривается ферментативная антиоксидантная защита при вегетососудистой дистонии (цефалгическом и гипертензивном синдроме).

Вегето-сосудистая дистония (ВСД) - полиэтиологический синдром, характеризующийся дисфункцией вегетативной нервной системы, и функциональными нарушениями со стороны практически всех систем организма. Выделяют множество клинических проявлений ВСД, среди них: кардиалгический, гипертензивный, гипотензивный, цефалгический, дезадаптационный [1].

Цефалгический синдром характеризуется головными болями, головокружением, шумом в голове и ушах, склонностью к обморокам. В основе его развития лежат церебральные ангиодистонии, патогенетической основой которых является дисрегуляция тонуса сосудов мозга гипертонического, гипотонического или смешанного характера. У части больных с упорным цефалгическим синдромом имеет место нарушение тонуса не только артериальных, но и венозных сосудов - так называемая функциональная венозная гипертензия.

Гипертензивный синдром проявляется повышением артериального давления вследствие несовершенства или расстройства регуляции вегетативных функций [2].

Наличие вариабельной клинической симптоматики, высокая частота встречаемости заболевания, отсутствие достоверных критериев диагностики диктует необходимость изучения молекулярных механизмов развития ВСД, в частности - выявление особенностей антиоксидантного ферментативного статуса эритроцитов.

Целью исследования явилось изучение статуса первой и второй линии ферментативной антиоксидантной защиты при вегетососудистой дистонии (цефалгическом и гипертензивном синдроме).

Клиническая группа представлена 15 подростками, с диагнозом ВСД, проявляющейся цефалгическим синдромом. Группа сравнения - 16 подростков с ВСД по гипертоническому типу. Подростки находились на лечении в окружном военном госпитале (1602 ОВКГ). Контрольная группа - 20 практически здоровых подростков.

Для оценки первой линии ферментативной антиоксидантной защиты (АОЗ) определяли активность супероксиддисмутаза (СОД) [3, 4] и каталазы [5]. О степени работы второй линии ферментативной АОС судили по активности глутатионзависимых ферментов – глутатионпероксидазы (ГПО) [6], глутатионредуктазы (ГР) [7], а также глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы [8] и концентрации восстановленного глутатиона [9].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили согласно общепринятым методам с определением средней арифметической, ошибки средней. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности $p < 0,05$ [10].

Было выявлено, что у пациентов с цефалгическим синдромом в сравнении с контрольной группой активность СОД повышалась на 312% ($p < 0,05$), активность каталазы повышалась на 170% ($p < 0,05$), коэффициент СОД/каталаза увеличивался на 52,46% ($p < 0,05$) в сравнении с контрольной группой. В клинической группе относительно значений контрольной группы обнаружено снижение активности всех ферментов второго звена АОЗ: ГПО на 15,34% ($p < 0,05$), ГР на 31,21% ($p < 0,05$) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на 29,53% ($p < 0,05$). В условиях ингибирования ферментов второй линии АОЗ концентрация восстановленного глутатиона выросла на 19,93%.

У подростков с ВСД по гипертоническому типу в сравнении с контрольной группой наблюдалось статистически значимое повышение активности СОД на 240% ($p < 0,05$), каталазы на 49% ($p < 0,05$), ГПО на 251% ($p < 0,05$) и концентрации восстановленного глутатиона на 92,3% ($p < 0,05$), при этом активность ГР снизилась на 39% ($p < 0,05$), а глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – на 35% ($p < 0,05$). Коэффициент СОД/каталаза на 129% ($p < 0,05$) в группе сравнения превышает значения в контрольной группе.

Выводы:

1. У пациентов с разным клиническим проявлением ВСД обнаружена однонаправленное изменение активности ферментов первой линии АОЗ, однако выраженное в разной степени, о чем свидетельствует выраженный в разной степени коэффициент СОД/каталаза.

2. Разнонаправленные изменения активности ферментов второй линии АОЗ в контрольной группе и группе сравнения могут свидетельствовать о разном патогенезе данных клинических синдромов.

Список литературы

1. Коваленко Т.Д. Изменение активности ферментов первой и второй линии антиоксидантной защиты у подростков с вегетососудистой дистонией (цефалгический синдром) / Т.Д. Коваленко, М.В. Агаршева, А.А. Аванесян, Г.Д. Алиева // Обмен веществ при адаптации и повреждении (дни лабораторной диагностики Южного Федерального округа). Материалы XII региональной научно-практической конференции с международным участием. Ростов-на-Дону. – 2013. – С.27-28.

2. Нагорная Г.Ю. Маркеры метаболического синдрома у подростков с эссенциальной артериальной гипертензией в сочетании с дисфункцией желчевыводящих путей / Г.Ю. Нагорная, З.И. Микашинович, Т.Д. Коваленко // Медицинский вестник Юга России. – 2014. - №3. – С.125-129.

3. Misra H.P. Superoxide dismutase / H.P. Misra, I. Fridovich // Biol. Chem. 1972. - V.247. P.188.
4. Саркисян О.Г. Биохимические изменения при атрофических кольпитах и их коррекция: Дис... канд. мед. наук. Ростов-на-Дону; 2000.
5. Королук М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лаб. Дело. – 1988. - №1. – С.16-9.
6. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В.М. Моин // Лаб. дело. – 1986. - №12. – С.724-727.
7. Юсупова Л.Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов / Л.Б. Юсупова // Лаб. дело. – 1989. - №4. – С.19-21.
8. Захарьин Ю.Л. Метод определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы / Ю.Л. Захарьин // Лаб. дело. – 1967. - №6. – С.327-330.
9. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. - V.82. – P.70-77.
10. Кулайчев А.П. Методы и средства анализа данных в среде Windows Stadia 6.0. - М. - 1996.

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ СЕКРЕЦИИ ГОРМОНОВ

Хамаде Адхам Зияд, Грекова Г.А., Лосева Т.Д., Рыбина И.Н.

*Кафедра химии подготовительного факультета по обучению
иностранных граждан РостГМУ МЗ России, Ростов-на-Дону*

Аннотация: в статье рассматривается механизм действия гормонов разного типа, регуляции секреции гормонов, их биологические эффекты.

Гормоны – это органические вещества, выделяемые железами внутренней секреции в небольших количествах, транспортируемые кровью к клеткам-мишеням других органов, где они проявляют специфическую биохимическую или физиологическую регуляцию. Некоторые гормоны синтезируются не только в эндокринных железах, но и клетками других тканей. Гормоны по химическому строению делятся на три группы: белковые и пептидные гормоны, стероидные гормоны и гормоны, являющиеся производными аминокислот.

Пептидные гормоны представлены пептидами с небольшим числом аминокислотных остатков. К их числу относятся гормоны поджелудочной железы инсулин и глюкагон, гормон роста и другие. К производным аминокислот относятся гормоны адреналин, норадреналин, тироксин,

трийодтиронин. К стероидным принадлежат гормоны коры надпочечников и половые гормоны.

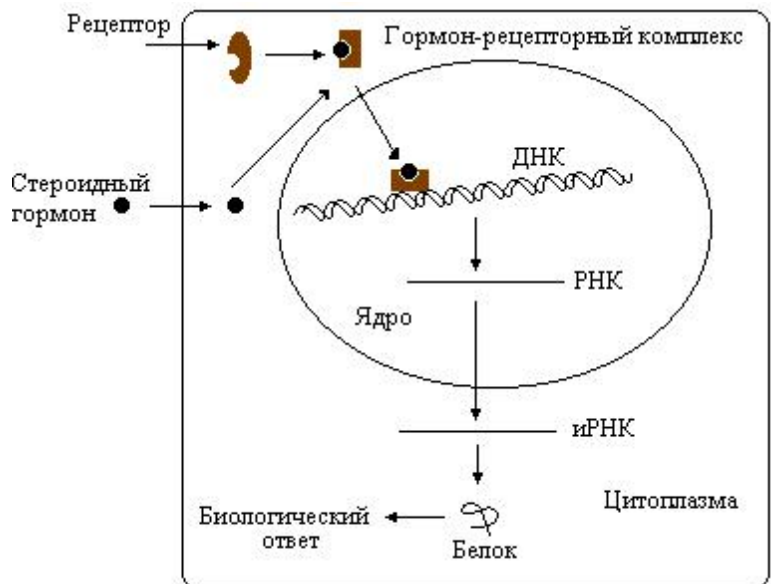
Верхнюю ступень в регуляции секреции гормонов занимает гипоталамус – специализированная область мозга. Этот орган получает сигналы из центральной нервной системы. В ответ на эти сигналы гипоталамус выделяет ряд регуляторных гипоталамических гормонов. Их называют релизинг-факторы. Это пептидные гормоны, состоящие из 3–15 аминокислотных остатков. Релизинг-факторы поступают в переднюю долю гипофиза – аденогипофиз, расположенный непосредственно под гипоталамусом. Каждый гипоталамический гормон регулирует секрецию какого-либо одного гормона аденогипофиза. Одни релизинг-факторы стимулируют секрецию гормонов, их называют либеринами, другие, наоборот, тормозят, это – статины. В случае стимуляции гипофизом в кровь выделяются так называемые тропные гормоны, стимулирующие деятельность других желез внутренней секреции. Те, в свою очередь, начинают выделять собственные специфические гормоны, которые воздействуют на соответствующие клетки-мишени. Надо отметить, что циркулирующие в крови гормоны в свою очередь тормозят деятельность гипоталамуса, аденогипофиза и желез, в которых они образовались [1]. Такой способ регуляции носит название регуляции по принципу обратной связи (рис.1).



Гормоны отличаются по своему быстросдействию. Одни гормоны вызывают быстрый биохимический или физиологический ответ. Например, печень начинает выделять глюкозу в кровь после появления адреналина в кровяном русле уже через несколько секунд. Ответ же на действие стероидных гормонов своего максимума достигает через несколько часов и даже дней. Столь значительные различия в скорости ответа на введение гормона связаны с различным механизмом их действия. Действие стероидных гормонов направлено на регуляцию транскрипции. Стероидные гормоны легко проникают через клеточную мембрану в цитоплазму клетки. Там они связываются со специфическим рецептором, образуя гормон-рецепторный комплекс. Последний, попадая в ядро, взаимодействует с ДНК и активирует синтез информационной РНК, которая далее транспортируется в цитоплазму и инициирует синтез белка (рис.2). Синтезированный белок определяет биологический ответ [2].

Рис. 1. Регуляция секреции гормонов

Действие пептидных, белковых гормонов, адреналина направлено не на активацию синтеза белка, а на регуляцию активности ферментов или других белков. Эти гормоны взаимодействуют с рецепторами, находящимися на поверхности клеточной мембраны.



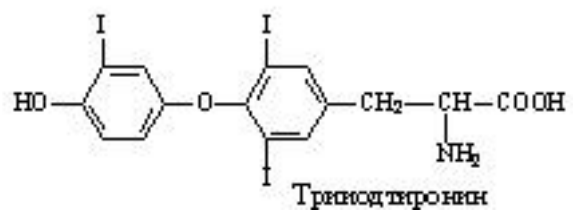
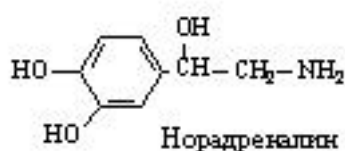
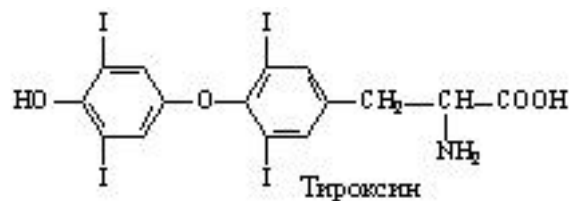
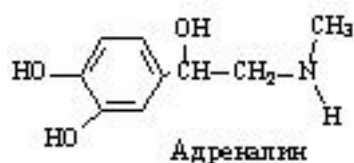
Образовавшийся гормон-рецепторный комплекс запускает серию химических реакций. В результате происходит фосфорилирование некоторых ферментов и белков, вследствие которого изменяется их активность [3]. В итоге наблюдается биологический ответ (рис. 3).

К гормонам, являющимся производными аминокислот, относятся гормоны мозгового слоя надпочечников (адреналин и норадреналин) и гормоны щитовидной железы (тироксин и трийодтиронин) (рис. 4). Все эти гормоны являются производными тирозина.



Рис. 3. Механизм действия пептидных гормонов

Органами-мишенями адреналина являются печень, скелетные мышцы, сердце и сердечно-сосудистая система. Близок по структуре к адреналину и другой гормон мозгового слоя надпочечников – норадреналин. Адреналин ускоряет ритм сердца, повышает кровяное давление,



стимулирует расщепление гликогена печени и увеличивает содержание глюкозы в крови, обеспечивая, таким образом, мышцы топливом. Действие адреналина направлено на то, чтобы подготовить организм к экстремальным условиям. В состоянии тревоги концентрация адреналина в крови может увеличиться почти в 1000 раз.

Рис. 4. Гормоны – производные аминокислот

Щитовидная железа, как отмечали выше, секретирует два гормона – тироксин и трийодтиронин, их соответственно обозначают T_4 и T_3 . Главным результатом действия этих гормонов является увеличение скорости основного обмена. При повышенной секреции T_4 и T_3 развивается так называемая Базедова болезнь. Больным свойственна повышенная возбудимость, у них наблюдаются тахикардия, потеря массы тела.

Дефицит гормонов щитовидной железы у детей приводит к задержке роста и умственного развития – кретинизму. Недостаточность иода в пище, а иод входит в состав этих гормонов, вызывает увеличение щитовидной железы, развитие эндемического зоба [4].

Пептидные и белковые гормоны - это наиболее разнообразная группа гормонов. К ним относятся релизинг-факторы гипоталамуса, тропные гормоны аденогипофиза, гормоны эндокринной ткани поджелудочной железы инсулин и глюкагон, гормон роста и многие другие.

Главной функцией инсулина является поддержание определенного уровня глюкозы в крови. Инсулин способствует поступлению глюкозы в клетки печени и мышц, где она в основном превращается в гликоген.

Глюкагон оказывает противоположное инсулину действие, он повышает содержание глюкозы в крови, способствует распаду гликогена в печени с образованием глюкозы, поступающей затем в кровь. В этом его действие сходно с действием адреналина.

Секретируемый аденогипофизом гормон роста, или соматотропин, ответствен за рост скелета и увеличение массы тела человека и животных. Недостаточность этого гормона приводит к карликовости, избыточная же его секреция выражается в гигантизме.

К стероидным гормонам принадлежат гормоны коры надпочечников и половые гормоны. В коре надпочечников синтезируются свыше 30 гормонов, их называют также кортикоидами. Глюкокортикоиды регулируют углеводный обмен, оказывают противовоспалительное и антиаллергическое действие. Минералокортикоиды поддерживают, главным образом, водно-солевой баланс в организме.

Среди половых гормонов различают андрогены (мужские половые гормоны) и эстрогены (женские половые гормоны). Андрогены стимулируют рост и созревание, поддерживают функционирование репродуктивной

системы и формирование вторичных половых признаков. Эстрогены регулируют активность женской репродуктивной системы [5].

Список литературы

1. Ершов, Ю.А. Биохимия человека: Учебник для академического бакалавриата / Ю.А. Ершов. – Люберцы: Юрайт, 2016. – 374.
2. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман. – М.: Бином, Лаборатория знаний, 2011. – 469 с.
3. Марри, Р. Биохимия человека / Р. Марри. – М.: Мир, 2009, - т.2. – 795 с.
4. Маршалл, В.Дж. Клиническая биохимия / В.Дж. Маршалл. – М.: Бином, 2019. – 408 с.
5. Титов, В.Н. Клиническая биохимия: курс лекций: Учебное пособие / В.Н. Титов. – М.: Инфра-М, 2015. – 272 с.

«МОЛЕКУЛЯРНЫЕ НОЖНИЦЫ» ИЛИ НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ МЕТОДА ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ CRISPR/CAS9

Дамянович Павле, Грекова Г.А., Лосева Т.Д., Рыбина И.Н.

Кафедра химии подготовительного факультета по обучению иностранных граждан РостГМУ МЗ России, Ростов-на-Дону

Аннотация: в статье рассматривается метод редактирования ДНК с помощью системы CRISPR/CAS9 («молекулярные ножницы»).

Чтобы успешно вторгаться в «святая святых» клетки — ее наследственный материал, необходимы технологии, позволяющие расщеплять и соединять молекулы ДНК в заданных участках. Для этих целей можно использовать рестриктазы — ферменты, способные «узнавать» определенные короткие нуклеотидные последовательности и расщеплять по ним молекулу ДНК с образованием «липких» концов. Для соединения нуклеотидных фрагментов используют ферменты ДНК-лигазы, которые входят в состав природных ферментных комплексов, исправляющих (репарирующих) повреждения в структуре ДНК.

Однако с помощью такого набора инструментов оказалось крайне трудно манипулировать большими сложными геномами высших организмов. Проблема заключалась в том, что ферменты рестрикции могут «узнавать» только относительно короткие последовательности ДНК. Такой специфичности вполне достаточно для работы с короткими ДНК вирусов и бактерий [1]. Но специфичности рестриктаз совершенно недостаточно для работы с геномами растений и животных. Такие геномы содержат множество коротких последовательностей нуклеотидов, которые узнаются

рестриктазами, поэтому направленное воздействие на один определенный участок становится невозможным. Между тем для решения большого числа важнейших задач биотехнологии и фундаментальной медицины требовались эффективные и точные инструменты для осуществления точечного воздействия на определенные участки ДНК в составах геномов высших организмов, в том числе человека.

В 2012–2013 гг. в этой области произошел поистине революционный прорыв: был разработан новый метод генетической инженерии CRISPR/Cas, открывший принципиально новые возможности для манипуляций на уровне генома высших организмов. Этот метод чрезвычайно прост, обеспечивает точное воздействие на заданные участки ДНК и может быть использован практически в любой современной молекулярно-биологической лаборатории [2]. В CRISPR/Cas структурами, узнающими ДНК, являются короткие РНК. Идея создания такой системы родилась при изучении механизмов, которые бактерии используют для защиты от своих патогенных вирусов (бактериофагов). Конкретно речь идет о своеобразных «иммунных» реакциях бактерий на проникновение определенного бактериофага, которая выражается в избирательном расщеплении его геномной ДНК.

Работа этого механизма обеспечивается специальными участками бактериального генома — CRISPR-локусами (от Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами).

Бактериальный CRISPR-локус состоит из повторяемых последовательностей ДНК, между которыми располагаются спейсеры — небольшие фрагменты чужеродной ДНК (вирусной или плазмидной).

В случае проникновения в бактериальную клетку бактериофага запускается специфический механизм защиты. Сначала с CRISPR-локуса синтезируется протяженная первичная РНК, которая «созревает» — разрезается на более короткие фрагменты (crRNA). Каждая crRNA содержит участок, соответствующий спейсеру, и кусочки повторяющихся палиндромных последовательностей, отвечающие за привлечение Cas-белков. Спейсер комплементарно связывается с определенным участком в ДНК бактериофага, а белок разрезает ее.

С помощью системы CRISPR/Cas можно осуществлять все виды модификаций генома: вносить точечные мутации, встраивать в определенные места новые гены либо, наоборот, удалять крупные участки нуклеотидных последовательностей, исправлять или заменять отдельные генетические элементы и фрагменты генов. Благодаря своей простоте, эффективности и широким возможностям система CRISPR/Cas за короткое время уже нашла применение в самых различных областях фундаментальной и прикладной биологии, биотехнологии и медицины. С помощью системы CRISPR/Cas уже получен ряд мутантных лабораторных животных (мышей, крыс, лягушек, рыб). Все эти модельные организмы открывают новые перспективы для исследований в области биологии развития, иммунологии и изучения заболеваний человека и животных [3].

Уникальная способность комплекса системы CRISPR/Cas избирательно связываться с определенными участками ДНК позволила разработать на ее основе регуляторы активности генов. Одной из важнейших задач современной биомедицины является создание клеточных моделей для поиска и доклинического исследования новых лекарств. Внося направленные модификации в геном стволовых клеток человека, мы получаем линии клеток-моделей наследственных заболеваний, вызванных нарушениями функций определенных генов. Такие клеточные линии являются, по сути, неограниченным источником «пациентов в пробирке», на которых можно проводить тестирование десятков тысяч различных химических соединений — потенциальных лекарств.

Большие надежды на CRISPR/Cas возлагаются и в связи с развитием генотерапии. Несмотря на многолетние широкие исследования, до настоящего времени не удалось разработать приемлемых методов введения в клетки генов, замещающих дефектные. С помощью этого метода можно не вводить извне «чужие» гены, а редактировать собственный генетический аппарат, сохраняя «свои» системы регуляции. Так уже удалось отредактировать аномальный ген в стволовых клетках пациента, страдающего муковисцидозом. Такие клетки с «отремонтированным» геномом могут быть трансплантированы обратно в организм больного, где они заменят больные клетки и восполнят утраченную ими функцию.

Применение метода CRISPR/Cas в комбинации с клеточными технологиями открывает принципиальную возможность радикального избавления людей от генетических заболеваний, таких как сахарный диабет, хорея Хантингтона, мышечные дистрофии и др. Генетическое вмешательство может быть осуществлено на уровне эмбрионов, получаемых при проведении экстракорпорального оплодотворения, из которых можно вырастить организм, все клетки которого будут иметь модифицированный геном. Препятствием на пути развития таких технологий являются этические проблемы: вся необходимая техника уже существует и опробована на лабораторных животных.

Главной целью применения метода CRISPR/Cas в биотехнологии является создание генетически модифицированных животных и посевных растений, которые бы обладали новыми ценными свойствами. С помощью этой системы уже внесены модификации в геном пшеницы и табака, получены сорта риса, устойчивые к бактериям *Xanthomonas*, вызывающие бактериальную гниль, которая наносит большой экономический ущерб сельскому хозяйству.

Еще одним интересным биотехнологическим направлением применения системы CRISPR/Cas является получение линий животных или растений, способных синтезировать белки человека, например, инсулин, необходимый больным сахарным диабетом, или альбумин, использующийся при лечении геморрагического шока, ожогов и цирроза печени. Хотя система редактирования геномов CRISPR/Cas была создана лишь в 2012 г., она уже применяется во многих лабораториях и компаниях развитых стран.

Опубликованы сотни результатов исследований с применением этой технологии, описаны десятки успешных экспериментов по редактированию геномов дрожжей, грызунов, насекомых, растений и человеческих клеток [4].

За открытие метода редактирования ДНК с помощью системы CRISPR/CAS9 французский микробиолог Эммануэль Шарпантье и американский биохимик Дженифер Дудна получили в 2020 году Нобелевскую премию по химии.

Список литературы

1. Власов В. В. и др. Комплементарные здоровью. Прошлое, настоящее и будущее антисмысловых технологий // Наука из первых рук. 2014. № 1(55). С. 38–50.

2. Медведев С. П. Как отредактировать наследственность // Наука из первых рук. 2014, № 1 (55). С. 10–14.

3. Cong L., Ran F. A., Cox D. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // Science. 2013, V. 339. P. 819–823.

4. Schwank, G., Koo, B. K., Sasselli, V. et al. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients // Cell Stem Cell, 13, 653–658.

Содержание

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ В ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ ОНКОТЕРАПИИ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Сопов А.А., Шустанова Т.А.....3

БИОТЕХНОЛОГИЯ ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА Т-КЛЕТОК. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Рубанова В.Н., Шустанова Т.А.....5

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СТРЕССА

Шатов А.Ю., Шестакова Т.Е.....9

МИКРО-РНК В ПАТОГЕНЕЗЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Ахмед Мохамед, Шустанова Т.А.....10

ДЛИНА СТЕБЛЯ ДНК-ШПИЛЬКИ КАК ФАКТОР ЕЁ ОБРАЗОВАНИЯ. ММ РАСЧЁТЫ

Шатов А.Ю., Бачурин С.С.....13

СТРОЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ Cu(II) НА ОСНОВЕ БИС-
ГЕТАРИЛГИДРАЗОНОВ 2,6-ДИАЦЕТИЛПИРИДИНА

Аблялимова А.И., Туполова Ю.П., Попов Л.Д., Щербаков И.Н., Лидер Е.В.,
Лазаренко В.А., Четверикова В.А., Иванникова Е.В.....15

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПЕРВОЙ И ВТОРОЙ ЛИНИИ
АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У ПОДРОСТКОВ С РАЗНЫМИ
ФОРМАМИ ВЕГЕТО-СОСУДИСТОЙ ДИСТОНИИ

Ле Хоанг Тханг, Лосева Т.Д., Грекова Г.А.....17

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ СЕКРЕЦИИ ГОРМОНОВ

Хамаде Адхам Зияд, Грекова Г.А., Лосева Т.Д., Рыбина И.Н.....20

«МОЛЕКУЛЯРНЫЕ НОЖНИЦЫ» ИЛИ НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ
МЕТОДА ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ CRISPR/CAS9

Дамянович Павле, Грекова Г.А., Лосева Т.Д., Рыбина И.Н.....24