

Лаборатория молекулярной биомедицины



Лаборатория молекулярной биомедицины создана в 2000 году для изучения проблем, связанных с механизмами и способами подавления или предотвращения развития воспалительных процессов, вызванных агентами микробного, вирусного происхождения или аллергенами.

Исследования проводятся на крови добровольцев, на клеточном и молекулярном уровнях. Сотрудники лаборатории изучают механизмы активации клеток врождённого и приобретённого иммунитета различными агонистами, в частности, липополисахаридами (эндотоксинами) и аллергенами с помощью современных биохимических, иммунохимических и физических методов.

В лаборатории выполнены и защищены 1 докторская, 5 кандидатских, 2 магистерских диссертаций, дипломные и курсовые работы.

Сотрудники лаборатории

Заведующий лабораторией

д.м.н., академик Грачёв Сергей Витальевич

Главный научный сотрудник

д.б.н. Прохоренко Изабелла Рувимовна

Старшие научные сотрудники

к.б.н. Зубова Светлана Владимировна

к.б.н. Кабанов Дмитрий Сергеевич

Младшие научные сотрудники

асп. Морозова Анастасия Александровна

асп. Радзюкевич Ярослав Вадимович

асп. Серов Дмитрий Александрович

Главный специалист подразделения

Русанова Татьяна Викторовна

Сотрудничество

- Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
- Клинический центр Больницы ПНЦ РАН
- ИБК РАН, лаборатория клеточной нейробиологии
- ФИБХ РАН, лаборатория биологических испытаний
- ЯрГУ им. П.Г. Демидова

Приглашаем:

Лаборатория приглашает студентов и аспирантов биологических и химических специальностей для подготовки дипломных, магистерских и диссертационных работ. Работы, в основном, предлагаются по специальности «биохимия», «иммунология», «клеточная биология».

Аспиранты имеют статус аспирантов РАН. Студентам и аспирантам

предоставляется общежитие.

В Институте работает Диссертационный ученый совет, принимающий к защите кандидатские и докторские диссертации по специальности «биохимия».

Основные направления научной деятельности

В настоящее время исследования проводятся по трем основным направлениям:

1. Изучение механизмов развития воспаления, в частности, активации клеток врождённого иммунитета в ответ на липополисахариды различной структуры

Липополисахариды (ЛПС) являются важными составляющими внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Молекулу ЛПС рассматривают как активатор клеточного врожденного иммунитета. Интенсивность и характер ответа клеток врождённого иммунитета на эндотоксины определяются составом и структурными особенностями ЛПС. ЛПС ряда бактерий (патогенных штаммов *E. coli*, *S. enterica* серотип *Thyphimurium*) обладают чрезвычайной провоспалительной активностью. ЛПС индуцируют секрецию про- и протиповоспалительных цитокинов клетками врожденного иммунитета, изменение поверхностной экспрессии рецепторов TLR4-, CD14-, CD11b и Fcγ на указанных клетках, усиление фагоцитарной активности и продукции АФК («дыхательный взрыв»). С одной стороны, высокая чувствительность системы врожденного иммунитета к циркулирующим в крови эндотоксинам обеспечивает быстрое и своевременное элиминирование патогенов из организма хозяина. С другой стороны — при тяжелой отрицательной бактериемии высок риск развития системного воспаления, приводящего к септическому шоку и синдрому полиорганной недостаточности, ассоциированных с высокой смертностью.

К основным работам лаборатории в этом направлении можно отнести следующие:

- изучение роли структуры ЛПС на ответы иммунных клеток;
- исследование вклада каждого из белков рецепторного комплекса TLR4/MD-2, CD14, CD11b/CD18 в активации ядерного фактора NF-κB при стимуляции миелоидных клеток эндотоксинами;
- роль растворимых белков крови (sMD2, sCD14, LBP) в TLR4-зависимой активации внутриклеточных сигнальных путей клеток врожденного иммунитета;
- изучение роли рецепторов в различных ответах клетки на токсичные ЛПС разной структуры;

— исследование антагонистической активности нетоксичного липополисахарида из фототрофной бактерии *Rhodobacter capsulatus* PG в отношении различных эндотоксинов.

2. Исследование функциональной активности ТНР-1 клеток, дифференцированных различными агентами и их комбинациями, в ответ на эндотоксины

Клетки врождённого иммунитета играют важную роль в узнавании патогенов. Способность участвовать в иммунном ответе приобретается в процессе дифференцировки, т.е. специализации клетки, и выражается в изменении таких характеристик, как форма клеток, способность к адгезии, набор поверхностных рецепторов и др. ТНР-1 клетки являются промоноцитами. Впервые они были выделены из периферической крови мальчика с острой моноцитарной лейкемией. Вскоре последовало их разностороннее изучение: исследовалась фагоцитирующая активность, экспрессия поверхностных рецепторов, взаимодействие с другими клетками и т.д.

Для получения модельной системы, адекватной клеткам крови, ТНР-1 клетки дифференцируют до полноценных моноцитов/макрофагов. В качестве классических дифференцирующих агентов используют ретиноевую кислоту, витамин D₃ и форболовый эфир (РМА). Относительно недавно в литературе появились сведения о способности токсичных ЛПС дифференцировать ТНР-1 клетки. В лаборатории исследуется возможность комбинированного действия витамина D₃ и нетоксичного ЛПС *Rhodobacter capsulatus* PG дифференцировать клетки в моноцитарном направлении.

Для изучения стадии дифференцировки клеток проводятся следующие работы:

- исследование влияния условий дифференцировки ТНР-1 клеток на экспрессию поверхностных рецепторов TLR4, CD11b и CD14;
- исследование функциональной активности, в частности, фагоцитоза и наработки цитокинов, ТНР-1 клеток, дифференцированных различными агентами, в ответ на эндотоксины.

3. Исследование защитного эффекта ЛПС *Rhodobacter capsulatus* PG от активации клеток крови условно-здоровых доноров аллергенами домашнего пылевого клеща (HDM)

Аллергические реакции являются симптоматическим ответом на нормально безвредные экологические антигены, такие как пыльца, перхоть животных и клещи домашней пыли. Распространенность заболевания аллергической

астмой резко возросла за последние 50 лет. Это обостренное иммуномодулированное расстройство характеризуется хроническим воспалением дыхательных путей, образованием слизи и гиперчувствительностью дыхательных путей (AHR). Более 20 различных групп аллергенов, классифицированных в соответствии с их гомологией последовательности и биологической функцией, продуцируют наиболее распространенные виды клещей *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae*.

Обнаружено, что активный компонент аллергенов (белок Der p 2) активирует TLR4-зависимые внутриклеточные сигнальные пути. Это предполагает возможность использования блокаторов ответа на аллергены, подобных тем, которые применяют против эндотоксинов.

В связи с похожими путями активации клеток и эндотоксинами, и аллергенами в лаборатории изучаются механизмы активации клеток крови аллергенами, которые включают:

- исследование роли рецепторов в активации клеток цельной крови человека ЛПС и аллергенами;
- исследование механизма кумулятивного действия аллергена и эндотоксина.

Методы

Исследования выполняются на цельной крови человека, изолированных клетках крови и различных линиях клеток.

Для изучения функциональной активности клеток используются:

физические и физико-химические методы: спектрофотометрия, микроскопия, проточная цитофлуориметрия;

биохимические методы: иммуноферментный анализ, электрофорез белков и ЛПС, иммунный электрофорез белков и др.

Кроме того, в лаборатории при выполнении исследований используются методы: микробиологического культивирования бактерий на твёрдой и жидкой средах, центрифугирования, экстракции, диализа, концентрирования образцов с помощью роторного испарения, лиофильной сушки.

Публикации

Публикации в отечественных журналах

- Кабанов Д.С., Иванов А.Ю., Мелцер М., Прохоренко И.Р. Влияние встраивания липополисахаридов в мембрану эритроцитов человека на

- электрофоретическую подвижность. *Биологические мембраны*, 22 (5), 401-407 (2005)
- Прохоренко И.Р., Кустанова Г.А., Гражданкин Е.Б., Кабанов Д.С., Мурашев А.Н., Прохоренко С.В., Грачев С.В. Влияние липополисахаридов разной структуры на сердечно-сосудистые показатели крыс Wistar. *Доклады РАН*, 402 (6), 838-840 (2005)
 - Кабанов Д.С., Иванов А.Ю., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Влияние структуры липополисахарида на электроповерхностные характеристики эритроцитов человека при встраивании эндотоксина в мембраны клеток. *Биологические мембраны*, 23 (3), 243-247 (2006)
 - Зубова С.И., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Влияние хемотипа на взаимодействие *Escherichia coli* с бактерицидными белками. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 144 (8), 191-193 (2007)
 - Прохоренко И.Р., Золотущенко Е.В., Тарасевич Н.Ю., Авхачева Н.В., Сафронова В.Г., Грачев С.В. Вызванный *Escherichia coli* дыхательный взрыв у нейтрофилов человека, праймированных разными липополисахаридами. *Биологические мембраны*, 24 (6), 442-450 (2007)
 - Волошина Е.В., Зубова С.В., Прохоренко С.В., Косякова Н.И., Прохоренко И.Р. Сравнение эффектов разных хемотипов липополисахаридов из *E. coli* и *Salmonella* на синтез TNF- α и IL-6 макрофагоподобными клетками ТНР-1. *Медицинская иммунология*, 11 (6), 509-514 (2009)
 - Зубова С.В., Волошина Е.В., Косякова Н.И., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Активация моноклеаров крови человека липополисахаридами разного состава. *Медицинская иммунология*, 12 (4-5), 405-408 (2010)
 - Кабанов Д.С., Прохоренко И.Р. Структурный анализ липополисахаридов грамотрицательных бактерий (обзор). *Биохимия*, 75, 469-491 (2010)
 - Волошина Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова Н.А., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Влияние структуры липополисахаридов на синтетическую активность лимфоцитов крови человека. *ДАН*, 441 (3), 402-405 (2011)
 - Зубова С.В., Кабанов Д.С., Иванов А.Ю., Волошина Е.В., Проскуряков И.И., Кленина И.Б., Прохоренко И.Р. Влияние дифференцировки клеток ТНР-1 на характеристики плазматических мембран. *Биологические мембраны*, 28 (2), 118-126 (2011)
 - Кабанов Д.С., Прохоренко И.Р. Ответ на письмо Г. Матеры, А. Куирино, А.Г. Ламберти, А. Фока, М.К. Либерто. *Биохимия*, 76, 1318-1320 (2011).
 - Кабанов Д.С., Прохоренко И.Р. Связь между физико-химическими характеристиками и биологической активностью липополисахаридов. *Биологические мембраны*, 28 (4), 323-338 (2011)
 - Зубова С.В., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Участие Толл-подобного рецептора 4 в интернализации *Escherichia coli* нейтрофилами крови

человека в присутствии липополисахаридов. *Медицинская иммунология*, 14 (3), 219-222 (2012)

- Кабанов Д.С., Прохоренко И.Р. Участие Toll-подобного рецептора 4 и Fc рецепторов гамма в праймировании нейтрофилов человека эндотоксинами из *Escherichia coli*. *Биохимия*, 78 (2), 254-263 (2013)
- Волошина Е.В., Косякова Н.И., Прохоренко И.Р. Липополисахарид из *Rhodobacter capsulatus* обладает антагонистическим действием в отношении эффектов токсичных липополисахаридов и подавляет высвобождение TNF- α , IL-6 и IL-1 β в цельной крови человека. *Биологические мембраны*, 30 (5/6), 357-363 (2013)
- Кабанов Д.С., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Роль CD11b/CD18 рецептора в праймировании полиморфноядерных лейкоцитов человека гликоформами эндотоксина из *Escherichia coli*. *Биохимия*, 79 (8), 1015-1023 (2014)
- Зубова С.В., Кабанов Д.С., Серов Д.А., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Артефакты, возникающие при использовании буфера, блокирующего Fc-рецепторы лейкоцитов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 162 (8), 210-214 (2016)
- Кабанов Д.С., Серов Д.А., Зубова С.В., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Динамика подавления эффектов эндотоксинов липополисахаридом из *Rhodobacter capsulatus* PG. *Биохимия*, 81 (3), 401-409 (2016)
- Радзюкевич Я.В., Серов Д.А., Прохоренко И.Р. «Исследование влияния LBP на активацию клеток крови липополисахаридами разной структуры». III Всероссийская научная конференция молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» 12-14 сентября 2016 г. Санкт-Петербург. *Медицинский академический журнал*, 16 (4), 90-91 (2016)

Публикации в зарубежных журналах

- Karlsson M., Melzer M., Prokhorenko I., Johansson T., Wingsle G. Hydrogen peroxide and expression of hipI-superoxide dismutase are associated with the development of secondary cell walls in *Zinnia elegans*. *J. Exp. Bot.*, 56, 2085-2093 (2005)
- Kustanova G.A., Murashev A.N., Karpov V.L., Margulis B.A., Guzhova I., Prokhorenko I.R., Grachev S.V., Evgen'ev M.B. Exogenous heat shock protein 70 mediates sepsis manifestations and decreases the mortality rate in rats. *Cell Stress & Chaperones*, 11 (3), 276-286 (2006)
- Prokhorenko I.R., Zubova S.V., Ivanov A.Yu. et al. Interaction of Gramnegative bacteria with cationic proteins: dependence on the surface characteristics of the bacterial cell. *Int. J. Gen. Med.*, 2, 33-38 (2009)
- Prokhorenko I., Zubova S., Kabanov D., Voloshina E., Grachev S. Toll-like receptor 4 in phagocytosis of *Escherichia coli* by endotoxin active human neutrophils in whole blood. *Crit. Care*, 27, S40-41 (2012)

- Prokhorenko I., Kabanov D., Zubova S., Grachev S. CD11b and TLR4 in human neutrophil priming by endotoxins from *Escherichia coli*. *Crit. Care*, 17 (Suppl 4), 42-43 (2013)
- Prokhorenko I., Kabanov D., Zubova S., Grachev S. CD14 of human polymorphonuclear leukocytes in endotoxin priming for respiratory burst. *Crit. Care*, 20(Suppl. 3), 186-187 (2016)

Список монографий и глав из книг

- Vinokurov M., Yurinskaya M., Prokhorenko I., Grachev S. The effect of *Rhodobacter capsulatus* lipopolysaccharide on human blood phagocytes: a functional response and protection from the endotoxin-induced apoptosis. In: *Neutrophils: Lifespan, functions and roles in disease*. – New-York: Nova Science Publisher, 2010. Chapter 10: 311-324
- Грачев С.В., Прохоренко И.Р., Зубова С.В., Кабанов Д.С., Косякова Н.И., Мельцер М., Прохоренко С.В. Молекулярные механизмы взаимодействия токсинов с клетками-мишенями. – М: Изд-во «Медицинское информационное агентство», 2012. 256 с.

Участие в конференциях

- Зубова С.В., Серов Д.А., Кабанов Д.С., Прохоренко И.Р. Участие белков рецепторного комплекса TLR4/CD14/CD11b в активации NF-κB p50 при стимуляции моноцитов эндотоксинами. В сб.: Материалы Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 25-28 мая 2015 г.) – Пушино: Институт биофизики клетки РАН, 2015, т.1, 108-112
- Радзюкевич Я.В., Кабанов Д.С., Серов Д.А., Прохоренко И.Р. Исследование дифференцирующей активности липополисахаридов. В сб.: Eurasiascience. Сборник статей международной научно-практической конференции (Москва, 19 июня 2015 г.) / Под ред. В.Б. Соловьева – Москва-Пенза: «Научно-издательский центр «Актуальность.РФ», 2015, 6-7
- Серов Д.А., Зубова С.В., Кабанов Д.С., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Липополисахарид из фототрофной бактерии *Rhodobacter capsulatus* PG подавляет экспрессию провоспалительных цитокинов. В сб.: Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке» (Саранск, 23-25 сентября 2015 г.) – Саранск: Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, 2015, 235-238
- Серов Д.А., Кабанов Д.С., Зубова С.В., Косякова Н.И., Прохоренко И.Р. Динамика защитного действия липополисахарида из *Rhodobacter capsulatus* PG от токсических эффектов эндотоксинов. Медицинская

иммунология (специальный выпуск журнала «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге») 17, 45-46 (2015)

- International Sepsis Forum «Sepsis 2016», 06-08 December 2016, Paris, France. Poster presentation (Prokhorenko Isabella, Kabanov Dmitry, Zubova Svetlana, Grachev Sergey)
- Научно-практическая ежегодная конференция Больницы ПНЦ РАН, 06-07 декабря 2016 г., г. Пущино. Устный доклад (Радзюкевич Я.В., Кабанов Д.С.)
- Научно-практическая ежегодная конференция Больницы ПНЦ РАН, 06-07 декабря 2016 г., г. Пущино. Устный доклад (Серов Д.А., Прохоренко И.Р.)

Патенты

- Прохоренко И.Р., Грачев С.В., Зубова С.В. 2010. Патент RU №2392309. «Штамм *Rhodobacter capsulatus* PG – продуцент липополисахарида, антагониста эндотоксинов»
- Прохоренко И.Р., Грачев С.В., Зубова С.В., Кабанов Д.С. 2016. Патент RU № 2590696. «Средство для дифференцировки моноцитоподобных клеток»

Темы диссертаций и дипломных работ

Под руководством главного научного сотрудника лаборатории Прохоренко Изабеллы Рувимовны студенты и аспиранты проходят практику и выполняют курсовые, дипломные, магистерские и диссертационные работы.

Темы научных работ, выполненных в лаборатории молекулярной биомедицины:

Диссертационные работы

- Прохоренко И.Р. «Особенности биологической активности липополисахарида из фотосинтезирующей бактерии *Rhodobacter capsulatus* B10» (диссертация на присуждение ученой степени доктора биологических наук)
- Зубова С.В. «Влияние состава липополисахаридов на характеристики клеточной стенки бактерий» (диссертация на присуждение ученой степени кандидата биологических наук)
- Кабанов Д.С. «Изменение поверхностных характеристик мембраны эритроцитов при встраивании липополисахаридов грамотрицательных бактерий» (диссертация на присуждение ученой степени кандидата биологических наук)

- Волошина Е.В. «Исследование влияния структуры липополисахаридов на функциональные ответы клеток миелоидного ряда» (диссертация на присуждение ученой степени кандидата биологических наук)
- Прохоренко С.В. «Влияние липополисахарида *Rhodobacter capsulatus* на функциональные ответы фагоцитов крови и показатели сердечно-сосудистой системы при эндотоксическом шоке» (диссертация на присуждение ученой степени кандидата медицинских наук)
- Кустанов Г. А. «Влияние белка теплового шока 70 кДа и липополисахарида из *Rhodobacter capsulatus* на физиологические эффекты эндотоксинов» (диссертация на присуждение ученой степени кандидата биологических наук)

Магистерские, дипломные и курсовые работы

- Тарасевич Н.Ю. «Влияние липополисахаридов различной структуры на фагоцитарную активность нейтрофилов» (магистерская работа)
- Серов Д.А. «Исследование роли рецепторов CD11b/CD18, TLR4 и CD14 в передаче сигнала в ядро клетки при связывании эндотоксинов» (магистерская работа)
- Журавлев В.Е. «Влияние липополисахаридов из *Rhodobacter capsulatus* и *Salmonella typhimurium* на фагоцитоз нейтрофилов человека» (дипломная работа)
- Прасол Е.А. «Влияние цитохалазина D на ответные реакции праймированных нейтрофилов человека» (дипломная работа)
- Серов Д.А. «Исследование защитных эффектов липополисахарида из *Rhodobacter capsulatus* PG от действия эндотоксинов на синтез провоспалительных цитокинов в модельной системе» (дипломная работа)
- Орёл П.С. «Липополисахарид из *Rhodobacter capsulatus* PG антагонист эндотоксинов и липотейхоевых кислот» (дипломная работа)
- Радзюкевич Я.В. «Влияние условий дифференцировки THP-1 клеток на экспрессию поверхностных рецепторов TLR4, CD11b и CD14» (курсовая работа)
- Радзюкевич Я.В. «Исследование дифференцирующей активности эндотоксинов в зависимости от их структуры» (дипломная работа)