

Национальному
исследовательскому
Томскому
государственному
университету 140 лет

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Сборник научных трудов
XV Международной конференции студентов, аспирантов
и молодых ученых

РОССИЯ, ТОМСК, 24 – 27 апреля 2018 г.

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

Abstracts
XV International Conference of Students
and Young Scientists

RUSSIA, TOMSK, April 24 – 27, 2018

Volume 4. Biology and Fundamental Medicine

КОНФЕРЕНЦИЮ ПОДДЕРЖИВАЮТ:



Совет при Президенте Российской Федерации
по науке и образованию
Координационный совет по делам молодежи
в научной и образовательной сферах



издательство
МАНН, ИВАНОВ И ФЕРБЕР



Редакционно-
издательский дом
"ПостНаука"



ПРОГРАММА ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ

САЕ «Институт «Умные материалы и технологии» Национального исследовательского Томского государственного университета приглашает дипломированных специалистов пройти программу повышения квалификации

«СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В ПОЛУЧЕНИИ И ИССЛЕДОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ»

Направление 04.00.00 Химия

Модульная структура обучения:

Модуль 1: Новые подходы в получении и исследовании функциональных материалов

Модуль 2: Методы исследования структуры, состава и физико-химических свойств функциональных материалов

Профессиональные компетенции, формируемые в результате обучения:

- способностью проводить научные исследования по сформулированной тематике, самостоятельно составлять план исследования и получать новые научные и прикладные результаты (ПК-1);
- владением теорией и навыками практической работы в избранной области химии (ПК-2);
- готовностью использовать современную аппаратуру при проведении научных исследований (ПК-3);
- способностью участвовать в научных дискуссиях и представлять полученные в исследованиях результаты в виде отчетов и научных публикаций (стендовые доклады, рефераты и статьи в периодической научной печати) (ПК-4).

Обучение в рамках образовательной программы реализуют ученые с высокой научной квалификацией из ведущих научных организаций РФ и зарубежья. практическая часть курса проводится с использованием современного аналитического и исследовательского оборудования Томского регионального центра коллективного пользования и на базе структурных подразделений САЕ Институт «Умные материалы и технологии».

КОНТАКТЫ

Руководитель программы: Курзина Ирина Александровна, д.ф-м.н., профессор кафедры физической и коллоидной химии ХФ, директор Института «Умные материалы и технологии» НИ ТГУ, kurzina99@mail.ru.

Координатор программы: Сюсюкина Владислава Александровна, менеджер учебного офиса САЕ «Институт «Умные материалы и технологии» НИ ТГУ, syusyukina_vlada@mail.tsu.ru.

АДРЕС

Россия, ул. А. Иванова, 49, г. Томск, Томская обл., 634028 (Химический факультет ТГУ)

Национальный исследовательский Томский политехнический университет
Национальный исследовательский Томский государственный университет
Томский государственный архитектурно-строительный университет
Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

Сборник научных трудов
XV Международной конференции студентов, аспирантов
и молодых ученых

24–27 апреля 2018 г.

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

Volume 4. Biology and Fundamental Medicine

XV International Conference of students, graduate students
and young scientists

April 24–27, 2018

Томск 2018

УДК 501:004 (063)

ББК 72:32.81л0

П27

Перспективы развития фундаментальных наук : сборник трудов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Томск, 24–27 апреля 2018 г.) : в 7 т. Т. 4: Биология и фундаментальная медицина / под ред. И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск : Издательский Дом Томского государственного университета, 2018. – 187 с.

ISBN 978-5-94621-727-9 (отд. кн.)

ISBN 978-5-94621-723-1

Сборник содержит труды участников XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспективы развития фундаментальных наук», представленные на секции «Биология и фундаментальная медицина».

Для студентов, аспирантов, молодых ученых и преподавателей, специализирующихся в области анатомии и физиологии, иммунологии, неврологии и психиатрии, клеточной биологии и гистологии, генетики, биохимии и молекулярной биологии, микробиологии и вирусологии, биофизики, биотехнологии, биоинженерии, фармакологии и фармакогнозии, кибернетики и биоинформатики, а также биоматериалов: исследований *in vitro* и *in vivo*.

УДК 501:004 (063)

ББК 72:32.81л0

Редакционная коллегия

И. А. Курзина, доктор физико-математических наук, доцент;

Г. А. Воронова, кандидат химических наук, доцент;

С. А. Поробова.

ISBN 978-5-94621-727-9 (отд. кн.)

ISBN 978-5-94621-723-1

© Авторы, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ CD117+ КЛЕТОК В СТРОМЕ ИКНТ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СВЯЗЬ С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ В.В. Алифанов, Л.С. Ляпунова, Л.А. Таширева	9
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТЕРИАЛОВ ГИДРОКСИАПАТИТА, РАСПРЕДЕЛЕННОГО В МАТРИЦЕ КРИОГЕЛЯ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА, ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ А.Р. Бабешин, П.М. Калачикова, Д.Н. Лыткина	12
ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ХОДЕ ИММУНОТЕРАПИИ АУТОЛОГИЧНЫМИ АКТИВИРОВАННЫМИ Т-КЛЕТКАМИ Е.А. Блинова, А.Е. Макарова, Е.А. Пашкина	15
ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИИ КАРДИОМИОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА АССОЦИИРОВАННОЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА О.В. Будникова	18
РЕПЕРТУАР КОСТНОМОЗГОВЫХ КЛЕТОК ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЛИМФОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМОЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ А.В. Бузенкова, Р.Х. Мухамеджанов, Л.А. Таширева	21
ВЛИЯНИЕ НАНОСЕКУНДНЫХ МИКРОВОЛНОВЫХ ИМПУЛЬСОВ НА УРОВЕНЬ КОРТИКОСТЕРОНА А.В. Васильев, А.А. Гороховский	24
ГЕН ФЛАВОНОИД 3', 5'-ГИДРОКСИЛАЗЫ ЯЧМЕНЯ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ А.В. Вихорев, К.В. Стрыгина	27
IN SILICO ПОСТРОЕНИЕ СЕТИ ИЗ ГЕНОВ- МОДИФИКАТОРОВ ХОРЕИ ГЕНТИНГТОНА, ОБНАРУЖЕННЫХ ПРИ ПОЛНОГЕНОМНОМ СКАНИРОВАНИИ Д.Е. Гомбоева	30
ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ ЭКСТРАСИСТОЛИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА МИОКАРД КРЫС 4 И 24 МЕСЯЧНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ПОСТИНФАРКТНОГО КАРДИОСКЛЕРОЗА А.А. Гороховский, А.В. Васильев	33
ВКЛАД ЭСТРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА АЛЬФА В МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ЭНДОКРИННОЙ ТЕРАПИИ ТАМОКСИФЕНОМ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Т.А. Дронова, С.В. Паталяк	36
ИММУНОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА КУКУРБИТ(н)УРИЛОВ (n=6,7,8) А.А. Ермаков, А.А. Актанова, Е.А. Пашкина	39
ВЛИЯНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И.Б. Жамангарина, Н.А. Лушникова, М.Р. Патышева	42
БЛОКАДА D2 ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ КАК НОВЫЙ ПОДХОД КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ В АЛЬВЕОЛЯРНОЙ ПАРЕНХИМЕ И РЕГУЛЯЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭМФИЗЕМЕ ЛЕГКИХ М.А. Жукова, Э.С. Пан, В.А. Крупин	45
ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В СОСТАВЕ ТАРГЕТНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ А.А. Захарова, О.Я. Брикунова, Т.Р. Низамов	48
СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ У ВПЧ16-ПОЗИТИВНЫХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ М.К. Ибрагимова, А.М. Певзнер	51

ВЛИЯНИЕ ФИЛЬТРАЦИИ НА КЛАССИФИКАЦИЮ СПЕКТРАЛЬНЫХ ДАННЫХ Э.Э. Ильясова, А.И. Князькова, Е.А. Сандыкова	54
МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ- ЛИГАНДОВ ДЛЯ ГАМКА РЕЦЕПТОРОВ Е.А. Иманкулова, К.С. Станкевич	57
ИНДЕКС МЕТИЛИРОВАНИЯ ИМПРИНТИРОВАННЫХ ГЕНОВ <i>GNAS</i> И <i>GRB10</i> ПРИ НАРУШЕНИЯХ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА А.А. Кадралиева	60
ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ИНГИБИТОРА TDP1 Е.О.Казакова	63
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ ЛАКТОНОВ О.А. Кайдаш, Ю.А. Пфаргер	66
INTERRELATION OF THE FINGER INDEX AND THE DEVELOPMENT OF SUBJECT-COGNITIVE ABILITIES OF SCHOOL CHILDREN S.M. Kaitova, I.R Dyo., Sh.R. Arutyunyan	69
ОЦЕНКА ТРАНСМИССИВНОСТИ БЛРС-КОДИРУЮЩИХ ПЛАЗМИД У МОЧЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ <i>E. COLI</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ АМБУЛАТОРНЫХ ПАЦИЕНТОВ Е.И. Катаева	72
РОЛЬ STAB1IN-1 ПОЗИТИВНЫХ МАКРОФАГОВ В ПОСТИНФАРКТНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ МИОКАРДА Б.Е. Ким	75
ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ПЛОДОВ АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ (<i>ARONIA MELANOCARPA (MICHX.) ELLIOT</i>) НА ЭРИТРОИДНЫЙ РОСТОК КРОВЕТЕВОРЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ К.М.Кириленко, О.Ю. Рыбалкина	78
РОСТ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА В ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ К.М. Климова	81
THE NEW APPROACH TO THE TREATMENT OF POSTOPERATIVE VENTRAL HERNIAS А.М. Kodirova, I.O. Kalyakanova, Z.S. Kaitova	84
ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ПОЛИТЕТРАФТОРЭТИЛЕНА В КАЧЕСТВЕ РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ ПРИ ДЕФЕКТАХ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ А.Д. Коняева, С.А.Крикова	87
РАДИОЧАСТОТНАЯ АБЛЯЦИЯ ВЕН КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ А.Л. Кулакова	90
УЛУЧШЕНИЕ КАЧЕСТВА ПЛАНИРОВАНИЯ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С КАРДИОУСТРОЙСТВАМИ А.Ю. Курзюкова	93
ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЦИСПЛАТИНА И.В. Ларионова, Т. Лиу, В.Б. Рябов	96
ГЕКСААЗОИЗОВЮРЦИТАН – АНАЛЬГЕТИК НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ К.А. Лопатина, Е.А. Сафонова, О.Ю. Рыбалкина	99
ГЕТЕРОГЕННОСТЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ TH2-ЛИМФОЦИТОВ И ILC2 В МИКРООКРУЖЕНИИ МОРФОЛОГИЧЕСКИ ОБОСОБЛЕННЫХ СТРУКТУР ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И СВЯЗЬ С ЛИМФОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ Л.С. Ляпунова, К.О. Завгородская, Л.А. Таширева	102
ВЛИЯНИЕ КОЛЛОИДНОГО РАСТВОРА КРЕМНИЯ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПШЕНИЦЫ Б.И. Макаров	105

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНОВ <i>ADAMTS1</i> , <i>RBFOX2</i> И <i>THBS1</i> НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ РЕГУЛЯЦИЮ И КЛОНАЛЬНУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i> А.А. Мурашкина, Р.Р. Савченко	108
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СОМАТО-СТВОЛОВОГО ПЕРЕХОДА И МАКРОФАГ-АССОЦИИРОВАННЫХ ГЕНОВ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Ю.А. Небова, М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов	110
ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИМФЕДЕМЫ МЕТОДОМ МНОГОФОТОННОЙ МИКРОСКОПИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ В.В. Николаев, А.С. Курочкина, Д.А. Вражнов	113
ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ИНВАЗИВНОГО РОСТА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СВЯЗЬ ИХ ЭКСПРЕССИИ С ПРОГНОЗОМ ЗАБОЛЕВАНИЯ Н.М. Новиков, Т.С. Геращенко, Н.В. Крахмаль	116
РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА <i>DIOL</i> В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ Э. А. Пашковская	119
ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ИПМИ В СОЧЕТАННОМ ДЕЙСТВИИ С ДОКСОРУБИЦИНОМ <i>IN VITRO</i> Е. А. Просекина	122
МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ С ПОМОЩЬЮ МИКРОДУГОВОГО ОКСИДИРОВАНИЯ В ПРИСУТСТВИИ РАСТВОРОВ ПОЛИМЕРОВ. ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА А.А. Ракина	125
МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И ТЕРМОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПОДКОЖНОЙ БЕЛОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИРОДНЫХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ К.И. Расторгуева, Н.А. Гурков	128
КОНТРОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА НА ОСНОВЕ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В.В. Романчук, В.Н. Неужин, Р.Т. Насибуллин	131
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТА <i>ACONITUM VAIKALENSE STENB.</i> НА РАЗВИТИЕ ВОСПАЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ЭПИТЕЛИЯ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ О.Ю. Рыбалкина	134
УРОВЕНЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНА H3 В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ С НОКАУТОМ <i>ADAMTS1</i> , <i>THBS1</i> И <i>RBFOX2</i> Р.Р. Савченко, С.А. Васильев, В.С. Фишман	137
ГЕМОСТИМУЛИРУЮЩИЕ И ЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИСАХАРИДОВ <i>TUSSILAGO FARFARA L.</i> В УСЛОВИЯХ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ Е. А. Сафонова, К.А. Лопатина, В.А. Машанова	140
ВЛИЯНИЕ АЛИМЕНТАРНОГО ДИСБАЛАНСА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ РАСТУЩИХ КРЫС-САМОК К.Е. Сычева, Д.В.Шестаков	143
ГОРМОНЫ СТРЕССА: КОРТИЗОЛ, АДРЕНКОРТИКОТРОПНЫЙ ГОРМОН И ОКСИТОЦИН В КОНТЕКСТЕ СОЦИАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА А.В. Тимофеева, Ю.Ю. Филиппов	146
ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕАЛИЗАЦИИ ГИДРООСМОТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ВАЗОПРЕССИНА В ПОЧКЕ КРЫС В.В. Третьякова	149
ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ В ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗЕ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА Е.А. Тугутова, А.И. Князькова, А.А. Цыденова	152

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ДНК-МАРКЕРЫ ПРИ МОНИТОРИНГЕ РАКА ЛЁГКОГО: АНАЛИЗ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ РЕТРОЭЛЕМЕНТОВ LINE-1 Л.А.Умарова, А.А. Пономарева	155
ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ <i>ACONITUM VARBATUM</i> PATR. EX PERS. КАК ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ М.В. Филонова, Е.С. Филоненко	158
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИЙ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ОТВЕТА НА ХИМИОТЕРАПИЮ Д.С. Халяпин, И.В. Ларионова	161
НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА АЛКАЛОИДА Z77 И МЕХАНИЗМЫ ИХ РАЗВИТИЯ А.В. Чайковский Г.А. Просекин	164
ВЛИЯНИЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА НА ГЕМОДИНАМИКУ, РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ И ВАЗОДИЛАТАТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭНДОТЕЛИЯ У КРЫС SHR В ПЕРИОД РАЗВИТИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ А.Ю. Шаманаев	167
ВЛИЯНИЕ ОПТИЧЕСКОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ НА ФОТОСШИВАНИЕ СКЛЕРЫ М.Е. Швачкина	170
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ГОМЕОСТАТИЧЕСКОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ НА Т-РЕГУЛЯТОРНЫЕ КЛЕТКИ <i>IN VITRO</i> Д.В. Шевырев	173
ИЗМЕНЕНИЯ В АКТИВАЦИИ МОТОНЕЙРОННЫХ ПУЛОВ ПОСТУРАЛЬНО-ТЕТАНИЧЕСКОЙ МУСКУЛАТУРЫ ПРИ ГИПОКСИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ А.С. Шилов, Е.А. Уляшева, А.В. Лахтионов	176
ВЛИЯНИЕ МАКРОФАГОВ НА ПРОЦЕСС ДЕГРАДАЦИИ ПОЛИМЕРА А.С. Шляхтун, Е. Шаповалова	179
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ПРОГРЕССИИ И ИНГИБИРОВАНИЯ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ ИЗМЕНЕНИЙ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ А.А. Щеголева, А.В. Исаева, Л.С. Ляпунова	182
АБДОМИНАЛЬНАЯ ЖИРОВАЯ ТКАНЬ АУТБРЕДНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПРИ АДАПТАЦИИ К РАЗНЫМ ТЕМПЕРАТУРНЫМ РЕЖИМАМ А.В. Якуненков	185

**АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ CD117+ КЛЕТОК В СТРОМЕ ИКНТ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СВЯЗЬ С
МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ**

В.В. Алифанов, Л.С. Ляпунова, Л.А. Таширева

Научный руководитель: профессор, д.м.н. М.В. Завьялова

Сибирский государственный медицинский университет,

Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050

E-mail: d27erosep@yandex.ru

**ANALYSIS OF CD117+ CELLS IN INVASIVE BREAST CANCER OF NOT SPECIAL TYPE,
ASSOCIATION WITH METASTASES**

V.V. Alifanov, L.S. Lyapunova, L.A. Tashireva

Scientific supervisor: Prof., MD, M.V. Zavyalova

Siberian State Medical University,

Russia, Tomsk, Moskovskiy trakt, 2, 634050

E-mail: d27erosep@yandex.ru

Abstract. *In the present study we performed analysis of CD117-positive cells microenvironment of invasive breast cancer of not special type and association with metastases. Hematogenous metastases are the main cause of death of patients with breast cancer. One of the main factors in the formation of metastases is the presence, nature and severity of inflammation. Innate lymphoid cells are involved in the homeostasis of a variety of tissues, and are also a link between innate and adaptive immunity. Expression of CD117 in the cells of the inflammatory infiltrate was assessed semi-quantitatively (0 points - absence, 1 point - 1-5 cells, 2 points - 6-20 cells, 3 points - more than 20 cells) near each variant of the parenchymatous component of the tumor (tubular, alveolar, trabecular and discrete groups of tumor cells) no further than 2 small lymphocyte diameters. Beyond any tumor structures, the number of CD117-expressing cells ($1,55 \pm 0,87$) significantly exceeded the amount in the tumor microenvironment ($p < 0,05$). The significantly higher number of CD117 + cells in the microenvironment of solid structures is found in patients with hematogenous metastases compared with patients without it ($1,33 \pm 0,57$ and $1,00 \pm 0,21$, respectively, $p < 0,05$). In addition, significantly higher number of CD117 + cells are found outside of any tumor structures in the group of patients with hematogenous metastases ($2,50 \pm 0,37$ and $1,40 \pm 0,70$, respectively, $p < 0,05$). The development of hematogenous metastases in patients with IC NST is associated with a higher number of CD117 + cells near the solid structures of the parenchymatous component, as well as outside any tumor structures.*

Введение. Гематогенные метастазы в подавляющем количестве случаев являются причиной смерти больных раком молочной железы, занимающим первое место среди злокачественных новообразований у женщин во всем мире [1]. При этом одними из основополагающих факторов формирования метастатического потенциала опухоли являются наличие, выраженность и характер иммуновоспалительных процессов, протекающих в микроокружении опухоли [2, 3]. В последнее десятилетие была идентифицирована новая группа клеток врожденного звена иммунитета – лимфоидные клетки врожденной иммунной системы (ILC – innate lymphoid cell). Эти клетки принимают участие в

гомеостазе множества тканей, а также являются связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом [4].

Семейство ILC состоит из трех различных групп: группа 1 ILC (ILC1), группа 2 ILC (ILC2) и группа 3 ILC (ILC3) включающая LT α клетки [5]. Все клетки семейства ILC характеризуются классической лимфоидной морфологией, а также отсутствием экспрессии поверхностных линейных молекул, которые свойственны лимфоидным элементам адаптивного иммунного ответа [4]. Показано, что у человека ILC3 экспрессируют CCR6 и CD117 (c-kit) [6].

Существуют работы, показывающие *in vitro* участие лимфоидных клеток врожденной иммунной системы в развитии опухоли. Так, было показано, что ILC3 способствуют пролиферации клеток меланомы, экспрессирующих CCL21, который ассоциирован с формированием иммуносупрессорного опухолевого микроокружения [7]. Однако, другое исследование демонстрирует ILC3-опосредованную регрессию клеток B16 меланомы, которые экспрессируют IL-12 [8]. Работы последних лет демонстрируют роль ROR γ t⁺ ILC3 в промоции лимфогенного метастазирования через модуляцию локального хемокинового контекста в микроокружении опухоли [9].

Цель исследования. Оценить количество CD117-экспрессирующих клеток вблизи различных паренхиматозных структур инвазивной карциномы не специфического типа молочной железы, а также связь с развитием гематогенных метастазов.

Материалы и методы. В исследование было включено 29 больных с инвазивной карциномой не специфического типа молочной железы (ИКНТ). Образцы тканей фиксировались в 10 % нейтральном формалине. Материал обрабатывался по стандартной методике и заливался в парафин. Срезы толщиной 7 мкм окрашивались антителами против CD117 (RTU, Dako, США), являющегося маркером ILC3 среди клеток лимфоидной морфологии. Экспрессию CD117 в клетках воспалительного инфильтрата оценивали полуколичественно (0 баллов – отсутствие; 1 балл – 1-5 клеток; 2 балла – 6-20 клеток; 3 балла – более 20 клеток) вблизи каждого варианта структур паренхиматозного компонента опухоли (тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных и дискретных групп опухолевых клеток) не далее чем на 2 диаметра малого лимфоцита, а также в строме новообразования в отдалении от паренхиматозных структур. Срок наблюдения за больными для установления статуса гематогенного метастазирования составил 5 лет. Для статистической обработки был использован пакет программ Statistica 10.0.

Результаты. На первом этапе исследования мы сравнили количество CD117-экспрессирующих клеток вблизи различных паренхиматозных структур ИКНТ и в отдалении от таковых. Было показано, что наименьшее количество CD117+ клеток обнаруживалось вблизи тубулярных структур и равнялось $1,00 \pm 0,23$. В ряду солидные – альвеолярные – трабекулярные структуры количество CD117-экспрессирующих клеток увеличивалось ($1,04 \pm 0,21$; $1,05 \pm 0,23$; $1,14 \pm 0,47$, соответственно). Наибольшее количество CD117+ клеток наблюдалось в ближайшем микроокружении дискретных опухолевых клеток и составляло $1,19 \pm 0,67$. Вне каких либо опухолевых структур количество CD117-экспрессирующих клеток ($1,55 \pm 0,87$) достоверно превышало количество в микроокружении опухоли ($p < 0,05$).

Далее мы сравнили количество CD117-экспрессирующих клеток вблизи различных паренхиматозных структур ИКНТ у больных с наличием и отсутствием гематогенных метастазов. Оказалось, что достоверно большее количество CD117+ клеток в микроокружении солидных структур содержится у больных с гематогенными метастазами по сравнению с больными не имеющих таковых

($1,33 \pm 0,57$ и $1,00 \pm 0,21$, соответственно; $p < 0,05$). Кроме того, достоверно большее количество изучаемых клеток обнаруживается и вне каких либо структур опухоли в группе больных имеющих гематогенные метастазы ($2,50 \pm 0,37$ и $1,40 \pm 0,70$, соответственно; $p < 0,05$).

Выводы. Распределение CD117-экспрессирующих клеток гетерогенно в микроокружении ИКНТ. Развитие гематогенных метастазов у больных ИКНТ связано с более высоким количеством CD117+ клеток вблизи солидных структур паренхиматозного компонента, а так же вне каких-либо структур опухоли.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семиглазов В.Ф. Скрининг рака молочной железы // Практическая онкология. -2010.-Т. 11.-№2(42).-С 60-65.
2. Kitamura, T., Qian, B. Z., Pollard, J. W. (2015). Immune cell promotion of metastasis. *Nature Reviews Immunology*, no. 15, pp. 73-86.
3. Markman, J. L., Shiao, S. L. (2015). Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, no. 6, pp. 208-223.
4. Spits, H. (2013). Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology*, no. 13, pp. 145–149.
5. Klose, C. S. (2014). Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell*, no. 157, pp. 340–356.
6. Satoh-Takayama, N. (2008). Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity*, no. 29, pp. 958–970.
7. Shields, J. D., Kourtis, I. C., Tomei, A. A., Roberts, J. M., Swartz, M. A. (2010). Induction of lymphoid-like stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*, no. 328, pp. 749–752.
8. Eisenring, M., Berg, J., Kristiansen, G., Saller, E., Becher, B. (2010). IL-12 initiates tumor rejection via lymphoid tissue-inducer cells bearing the natural cytotoxicity receptor NKp46. *Nature Immunology*, no. 11, pp. 1030–1038.
9. Irshad, S., Flores-Borja, F. (2017). ROR γ ⁺ Innate Lymphoid Cells Promote Lymph Node Metastasis of Breast Cancers. *Cancer Research*, no. 77, pp. 1083-1096.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТЕРИАЛОВ ГИДРОКСИАПАТИТА,
РАСПРЕДЕЛЕННОГО В МАТРИЦЕ КРИОГЕЛЯ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА, ДЛЯ
РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ**

¹A.P. Babeshin, ²П.М. Калачикова, ²Д.Н. Лыткина

Научные руководители: ¹профессор, д.м.н. С.Р. Баширов,

²профессор, д.ф.- м.н. И.А. Курзина

¹Сибирский государственный медицинский университет,

Россия, г.Томск, Московский тр.,2, 634050

²Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г.Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: alexbabeshin@gmail.com

**BIOCOMPATIBLE HYDROXYAPATITE/POLYVINYL ALCOHOL CRYOGEL MATERIALS FOR
BONE TISSUE RGENERATION**

¹A.R. Babeshin, ²P.M. Kalachikova, ²D.N. Lytkina

Scientific Supervisor: ¹Prof, Dr. S.R. Bashirov,

²Prof., Dr. I.A Kurzina

¹Siberian State Medical University,

Russia, Tomsk, Moskovsky Highway 2, 634050

²National Research Tomsk State University,

Russia, Tomsk, Lenin Avenue 36, 634050,

E-mail: alexbabeshin@gmail.com

***Abstract.** Behavior of a cryogel of polyvinyl alcohol mineralized with calcium phosphates and the quality of bone formation was investigated in vivo in a Wistar rat strain that was formed by bone defects in the proximal metaphysis of both tibia, one of which was filled with a cryogel-based implant. For comparison, an intact rat was taken. Assessment of the quality of bone tissue formation between the implant and the damaged bone was performed after 60 days using computed tomography.*

Актуальность. На сегодняшний день разработка и внедрение в клиническую практику новых видов костно-пластических материалов остается актуальной темой. Деструктивные и дегенеративные заболевания, переломы и инфекционные поражения опорно-двигательного аппарата – всё это является предметом огромного количества исследований, направленных на разработку материалов и методов, которые смогут оказать остеоиндуцирующий и остеокондуцирующий эффект на организм человека.

Известен широкий спектр синтетических материалов. Одним из таких является никелид титана, который обладает высокими функциональными и биомеханическими свойствами. Однако, наличие токсического воздействия никеля на организм сдерживает его широкое применение для изготовления имплантатов [1]. Эндопротезы кобальто-хромового сплава являются высокопрочными имплантатами с низким износом, которые позволяют применять головки большого диаметра, что улучшает функциональные характеристики протеза. Но с продуктами износа этих имплантатов связан ряд

побочных явлений (металлоз мягких тканей, системное токсическое действие ионов кобальта и хрома, канцерогенное действие), ограничивающих их массовое применение.

Современная керамика привлекает своей абсолютной биоинертностью, прочностью и износостойчивостью. Недостатком при ее использовании являются такие осложнения, как: перелом компонентов эндопротеза, - что требует ревизионного вмешательства [2]. Также для замещения дефектов губчатой кости применяется полиметилметакрилат. Однако стабильность комплекса «полимер – кость» невысока вследствие образования соединительнотканной прослойки вокруг имплантата [3].

В условиях человеческого организма наиболее устойчивым является основной фосфат кальция – гидроксиапатит. Костный гидроксиапатит (ГА) формируется в виде пластинчатых кристаллов толщиной до 7 нм. Модифицирование фосфата кальция биосовместимыми полимерами приводит к улучшению его механических свойств, а также способствует его остеокондуктивному и остеогенному действию. Поливиниловый спирт (ПВС) является биосовместимым, доступным материалом. Благодаря наличию полярных гидроксильных групп он растворяется в воде с образованием водородных связей с молекулами воды. При замерзании растворы поливинилового спирта образуют криогели – трехмерные структуры, удерживающие воду. Криогели поливинилового спирта с фосфатом кальция характеризуются развитой, пористой трехмерной структурой. Такие свойства композитов позволяют использовать предлагаемые составы для закрепления и замены поврежденного участка кости во время операций. Это сократит период регенерации кости и снизит риск осложнений.

Целью исследования является получение данных о приживаемости композита в живом организме, а также данные о качестве образования костной ткани между имплантатом и поврежденной костью.

Материалы и методы. При проведении тестирований *in vivo* использовали крыс линии Wistar. Крыс разделили на две группы: интактная крыса и крыса, которой были сформированы костные дефекты в проксимальном метаэпифизе обеих большеберцовых костей. В рамках эксперимента выполнен переднемедиальный доступ к левой большеберцовой кости. В верхней трети голени выделенной кости просверлили отверстие через все слои. В отверстие костномозгового канала ввели композит фосфата кальция и ПВС. Рана была ушита послойно шовным материалом "Викрил" и обработана антисептиком. В качестве антисептика использовался 0,5% спиртовой раствор хлоргексидина. На правой задней конечности были выполнены аналогичные манипуляции, но без введения композита. Оперативные вмешательства выполнялись под ингаляционным наркозом с использованием наркозного аппарата Combi Vet. Наркоз осуществлялся газом «Севоран», активным компонентом которого является севофлуран. Для введения в общую анестезию ингаляцию осуществляют севофлураном в концентрации до 8%. Для поддержания анестетического эффекта продолжают ингаляции при снижении концентрации севофлурана до 0,5-3%. Длительность эксперимента составила 60 суток. Животных выводили из эксперимента ингаляционным воздействием 100% углекислого газа (CO₂) в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) и Федеральным законом РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. Забранные костные фрагменты были направлены на КТ-исследование. Томография проводилась совместно с кафедрой лучевой диагностики и лучевой терапии СибГМУ компьютерным томографом "Optima CT660".

Результаты. Полученный композитный материал представляет собой полимерную матрицу криогеля с равномерно распределенной неорганической фазой фосфата кальция со средним размером пор 50µm. Такой размер дает возможность для дальнейшей остеокондукции [4].

КТ-картина фрагментов. В кости с композитом на уровне проксимального диафиза визуализируется частично консолидированный перелом кортикального слоя кости, плотность на уровне дефекта +674 HU (единица Хаунсфилда). В полости костномозгового канала определяется облаковидное тело композита с плотностью +498...+512 HU, диаметр входящего отверстия до 3 мм (Рис.1). В кости с травмой на уровне проксимального диафиза определяется частично консолидированный дефект костной ткани диаметром 2,7 мм и плотностью +344 HU. Плотность губчатой костной ткани костномозговом канале составляет 84 HU. Плотность кортикального слоя интактной кости +1415 HU, а костномозгового канала +133 HU.



Рис.1. Определяется консолидация дефекта на 60-е сутки эксперимента и облаковидное тело композита

Выводы. Консолидация перелома наблюдается в случае обоих дефектов. Однако при использовании криогеля консолидация происходит интенсивнее, что подтверждается результатами компьютерной томографии. Положительным качеством криогеля является возможность его васкуляризации и пролиферации костной ткани в поры, следовательно, восстановления трофики кости. Таким образом, криогель поливинилового спирта, минерализованного фосфатами кальция может быть использован для замещения дефектов костной ткани. Для окончательных выводов требуется проведение дополнительных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Надеждин С.В. Оценка токсичности заготовок для имплантатов из никелида титана в опытах *in vitro* // Научные ведомости. – 2011. – Т. 3 (98). - № 14. – С. 163-167.
2. Скороглядов А.В. Твердые пары трения в эндопротезировании тазобедренного сустава. За и против // Российский медицинский журнал. – 2014. – Т. 20 (6). – С. 48—53.
3. Скрябин В.Л. Применение гидроксиапатита и пористого углерода для замещения крупных дефектов губчатой кости // Казанский медицинский журнал, – 2010. – Т. 91. № 4. – С. 552-555
4. Sopyana I. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications // Science and Technology of Advanced Materials, – 2007. – V. 8. – P. 116-123.

**ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ
С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ХОДЕ ИММУНОТЕРАПИИ АУТОЛОГИЧНЫМИ
АКТИВИРОВАННЫМИ Т-КЛЕТКАМИ**

Е.А. Блинова, А.Е. Макарова, Е.А. Пашкина

Научный руководитель академик РАН, профессор, д.м.н. В.А. Козлов
Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»,
Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14, 630099
E-mail: blinovaelena-85@yandex.ru

**IMMUNE STATUS DYNAMICS OF PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA
DURING IMMUNOTHERAPY WITH AUTOLOGOUS ACTIVATED T-CELLS**

E.A. Blinova, A.E. Makarova, E.A. Pashkina

Scientific Supervisor: academic RAS, professor, MD, V.A. Kozlov
Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology»,
Russia, Yadrintsevskaya street, 14, 630099
E-mail: blinovaelena-85@yandex.ru

Abstract. *In this study we investigated quality of life and immune status of patients with bronchial asthma (BA) during immunotherapy with autologous activated T-cells. Activated T-cells was injected subcutaneously according to scheme after receiving informed consent from patients. In the end of therapy course, it was observed a decreasing of symptoms and disease influence on patients' life. Patients with atopic BA demonstrated significant decline of IgE level after 2 and 7 months after beginning of the therapy, and there was no changes in IgE level in non-atopic patients. Immunotherapy with T-cells corrected the number of B-cells and phagocytic activity of granulocytes and monocytes that differed from the normative values.*

Введение. Стандартная терапия БА включает применение ингаляционных глюкокортикостероидов в комбинации с β_2 -агонистами длительного действия [1] и позволяет достичь контроля над заболеванием, тем не менее, часть больных (20-30 %) остается рефрактерной к традиционной терапии [2]. Современные научные исследования сосредоточены на разработке биологических препаратов, способных влиять на воспалительные механизмы и процесс ремоделирования дыхательных путей. Одним из таких подходов может стать иммунотерапия аутологичными активированными Т-клетками, нацеленная на усиление естественных механизмов регуляции иммунных реакций. Особенностью данной терапии служит индукция антиэрготипического ответа, в результате которого происходит элиминация активированных Т-лимфоцитов в организме за счет распознавания антиэрготипическими клетками маркеров активации (эрготопов) в комплексе с молекулами МНС [3, 4]. Поэтому актуальным является изучение влияния иммунотерапии активированными Т-клетками на показатели иммунного статуса при БА.

Материалы и методы. В исследование было включено 23 пациента (7 мужчин и 16 женщин в возрасте от 20 до 59 лет, средний возраст – $38,5 \pm 4,3$ лет) со средней степенью тяжести, находившихся на лечении в Клинике иммунопатологии НИИФКИ. У 15 пациентов была классифицирована экзогенная

(атопическая, с повышенным уровнем IgE), у 6 пациентов эндогенная (инфекционно-зависимая) и у 2 пациентов смешанная форма БА. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИФКИ. Пациентам после получения информированного согласия на фоне базисной терапии подкожно вводили аутологичные активированные Т-клетки в дозе 30-60 млн по схеме: 4 инъекции кратностью 1 раз в неделю и 6 инъекций кратностью 1 раз в месяц. Аутологичные активированные Т-клетки выделяли и активировали в соответствии с разработанным лабораторным регламентом [5]. Исследование динамики показателей иммунного статуса, уровня общего сывороточного IgE и качества жизни пациентов по опроснику AQLQ(S) проводили до и через 2, 7 месяцев после начала терапии. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Statistica 6.0. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Опросник AQLQ(S) содержит 4 блока: выраженность симптомов болезни, ограничение активности, эмоциональное состояние и зависимость от влияния окружающей среды. Через 7 месяцев от начала лечения наблюдалось достоверное улучшение практически во всех блоках опросника, в блоке «Симптомы» прирост составил в среднем 8 баллов и носил характер тенденции. Что свидетельствует об улучшении качества жизни пациентов с БА.

К окончанию иммунотерапии уровень общего сывороточного IgE у пациентов с atopической БА, изначально обладающих высокими значениями данного показателя, снизился на 30% (рис. 1). В группе пациентов с БА, у которых изначально значения IgE находились в пределах нормы, содержание иммуноглобулина в сыворотке сохранялось практически на том же уровне.

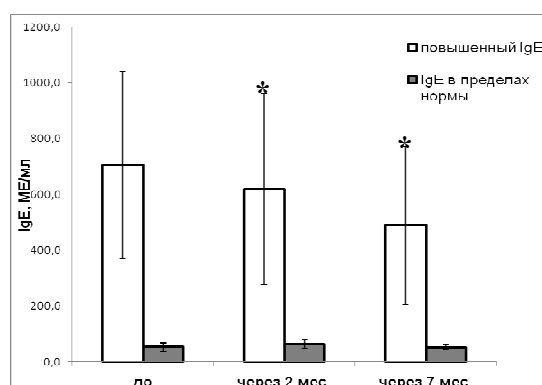


Рис. 1. Уровень общего сывороточного IgE в динамике иммунотерапии аутологичными активированными Т-клетками в группах пациентов с бронхиальной астмой с находящимся в пределах нормы и повышенным значением IgE.

* - достоверные отличия при сравнении с показателями до иммунотерапии, $p < 0,05$

До проведения иммунотерапии активированными Т-клетками пациенты с БА характеризовались повышенным числом CD19⁺ В-лимфоцитов и сниженным количеством фагоцитирующих гранулоцитов и моноцитов по сравнению с нормативными показателями. В ходе иммунотерапии на 5 и 10 введение достоверно снизилось число CD19⁺ В-лимфоцитов, оно достигло пределов нормы, что, возможно, связано с уменьшением числа CD23⁺ активированных В-лимфоцитов. Также наблюдалось снижение НК-клеток, что может ассоциироваться со снижением воспаления в легочной ткани и предрасположенности к инфекциям. Об этом же свидетельствует увеличение IgA, который осуществляет защитную функцию

слизистых оболочек дыхательной системы. В группе пациентов с показателями фагоцитоза в пределах нормы изменений уровня фагоцитоза в ходе иммунотерапии не происходило, в то время как в группе с изначально сниженными показателями наблюдалась нормализация фагоцитарной активности среди гранулоцитов и моноцитов (рис. 2).

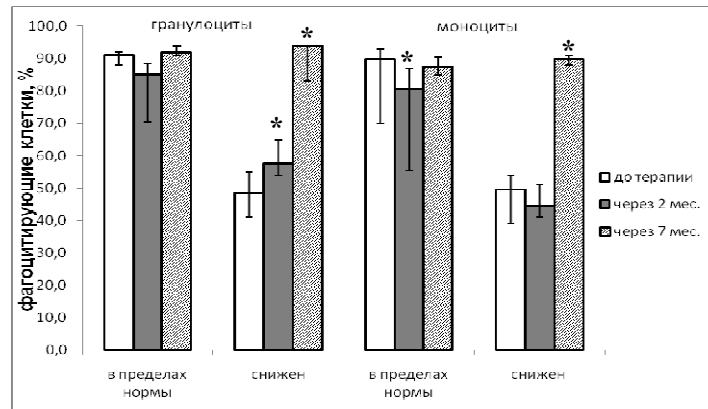


Рис. 2. Фагоцитарная активность гранулоцитов и моноцитов в динамике иммунотерапии аутологичными активированными Т-клетками у пациентов с бронхиальной астмой с низкими и находящимися в пределах нормы значениями фагоцитоза.

* - достоверные отличия при сравнении с показателями до иммунотерапии, $p < 0,05$

Заключение. Т-клеточная иммунотерапия сопровождалась улучшением качества жизни пациентов с БА. В ходе иммунотерапии уровень IgE не изменялся у пациентов со смешанной и эндогенной формах заболевания и достоверно снижался через 2 месяца и через 7 месяцев от начала лечения у пациентов с атопической формой заболевания, что, учитывая снижение симптомов и проявлений заболевания, свидетельствует о клинической эффективности данного способа лечения. Кроме того, введение аутологичных активированных Т-клеток корригировало отдельные показатели иммунного статуса и фагоцитарную активность клеток, которые до проведения иммунотерапии отличались от нормативных значений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бронхиальная астма – возможности терапии // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. - 2010. – № 9. – С. 28-31.
2. Федеральная целевая программа «Бронхиальная астма» (2011-2015 годы) – Москва: 2009. – 32 с.
3. Ильина Н.А., Кожевников В.С., Гойман Е.В., Кудяева О.Т., Колесникова О.П. Развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа в ответ на введение аутологичных активированных клеток // Омский научный вестник. - 2007. - Т. 3 (61). - С. 188-190.
4. Quintana F.J., Cohen I.R. (2006). Anti-ergotypic immunoregulation. Scand. J. Immunol., no. 64, pp. 205-210. Retrieved September 2006 from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16918688>.
5. Blinova E.A., Pashkina E.A., Tevs A.E., Nepomnyashchih V.M., Leonova M.I., Demina D.V., Kozlov V.A. (2017). The expression level of ergotop-associated markers on T-cells under the polyclonal activation in vitro in patients with atopic dermatitis [Electronic version]. Cell and Tissue Biology, no 6 (59), pp. 428-433.

**ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИИ КАРДИОМИОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ
БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА АССОЦИИРОВАННОЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА**О.В. Будникова

Научный руководитель: профессор, д.м.н. С.А. Афанасьев

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский

медицинский центр Российской академии наук,

Россия, г. Томск, ул. Киевская 111А, 634012

E-mail: budnikovaolesya@mail.ru

**PECULIARITIES OF THE FUNCTION OF CARDIOMYOCYTES IN PATIENTS WITH ISCHEMIC
HEART DISEASE ASSOCIATED WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2**O.V. Budnikova

Scientific adviser: Professor, MD S.A. Afanasyev.

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Russia,

Tomsk, Kievskaya st., 111a, 634012

E-mail: budnikovaolesya@mail.ru

Abstract. *The functional activity of myocardium in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and coronary heart disease (CAD) was studied. The study included patients with CAD with T2DM as representatives of the main group, the comparison group consisted of patients with univariant course of ischemic heart disease without violation of carbohydrate metabolism. Contractile activity of the myocardium was evaluated by the inotropic reaction of isolated trabeculae of patients according to the Protocol tests "Post-rest" and "Ekstrasistoliei test". As a result, it was found that rhythm-inotropic myocardial response in patients with comorbid pathology persists to a greater extent than in the one-dimensional flow of CAD.*

Введение. Сахарный диабет 2 типа (СД2) часто ассоциируется с фибрилляцией предсердий и желудочковыми аритмиями [1]. Предполагают, что это связано с дисфункцией Ca^{2+} транспортирующих систем саркоплазматического ретикулаума (СР) кардиомиоцитов, отвечающих за внутриклеточный гомеостаз Ca^{2+} , и соответственно, за инотропный ответ клетки. [2]. Однако остается открытым вопрос о функциональной активности миокарда в условиях коморбидной патологии с относительно небольшим сроком течения. В связи с этим, мы оценили влияние диабета на функциональную активность миокарда ушек правого предсердия пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС).

Материалы и методы исследования. Биоматериал ушек правого предсердия получен от пациентов с ИБС в сочетании с СД2 (n = 20) и пациентов с ИБС без диабета (n = 21), которым была выполнена операция коронарное шунтирование. Пациенты с СД2 были выбраны с продолжительностью диабета $4\pm 1,6$ года и уровнем HbA1c $7,5\pm 1,2$ %. Пациенты для группы контроля отбирались по уровню глюкозы в плазме натощак $\leq 6,0$ ммоль / л. Достоверных различий по длительности ИБС, возрасту и полу между больными основной и контрольной групп не отмечено.

Для исследования были использованы мышечные полоски диаметром 0,5-0,7мм. Образцы исследовали на установке «Standard system for muscle investigator» (SH Heidelberg, Germany) стимуляцию

трабекул проводили при базовой частоте 0,5 Гц. Регистрировали кривые изометрического сокращения папиллярных мышц. Сократительная активность изучалась по протоколу теста «Post-rest», при котором во время регулярных сокращений, прекращали стимуляцию на 4-60 сек с последующим возобновлением. Известно, что этот тест отражает кальций - аккумулирующую активность СР [3]. Экстрасистолическое воздействие оказывали при помощи однократного нанесения внеочередного электрического импульса через 0,2–1,5 с от начала регулярного цикла [4]. Этот тест позволяет оценить возбудимость миокарда. Измеряли амплитуду экстрасистолического и post - rest сокращения, которую выражали в процентах к амплитуде регулярного цикла.

Полученные результаты были обработаны статистически и представлены как $M \pm SD$ и Me (25-й процентиль; 75-й процентиль). Статистическую значимость различий оценивали по непараметрическому критерию U Манна-Уитни.

Результаты. Сокращение мышечных трабекул от пациентов с ИБС и СД 2 после выполнения теста «Post-rest» превышало базовые значения инотропной активности. Кроме того, наблюдалась отчетливая зависимость увеличения амплитуды инотропного ответа от длительности периода покоя. Так, после 4-х секундного периода покоя, потенция инотропного ответа составляла 17%, а после 60-ти секундного периода покоя была статистически значимо ($p < 0,05$) выше и составляла уже 62%. При моновариантном развитии ИБС, сила инотропного ответа на выполнении теста «Post-rest» оставалась практически на уровне базовых значений. При этом увеличение длительности периода покоя не влияло на амплитуду инотропного ответа у пациентов с коморбидной патологией (рис1).

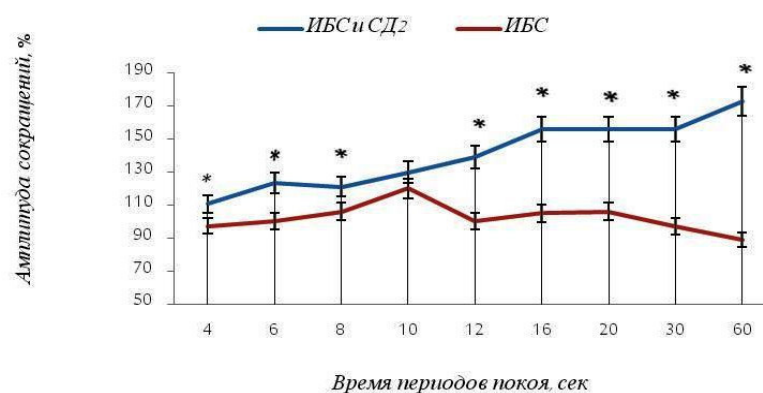


Рис. 1 Зависимость амплитуды сокращений трабекул от периода покоя пациентов с сочетанной патологией в сравнении с моновариантным течением ИБС.

Примечание. * - $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля

Выполнение «экстрасистолического теста» показало, что экстрасистолическое сокращение (ЭС) в группе пациентов с коморбидной патологией появлялось после нанесения электрического стимула через 0,5 с, тогда как ЭС миокарда в контрольной группе возникало при воздействии электрическим стимулом через 0,225 с. Это говорит о снижении возбудимости клеток сердца у пациентов контрольной группы. Инотропный ответ трабекул пациентов основной группы на внеочередной стимул повышался с увеличением длительности экстрасистолического интервала (рис. 2).

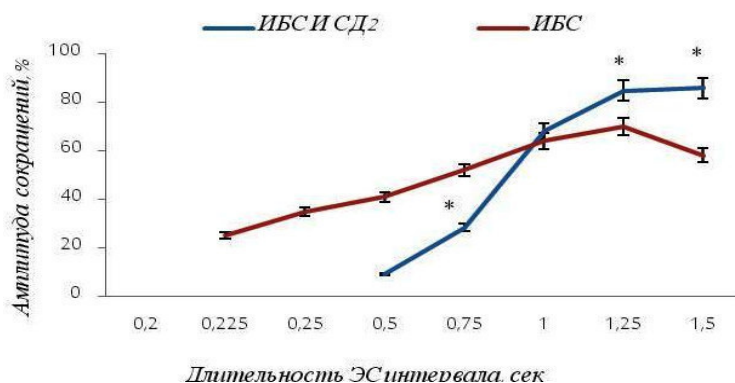


Рис.2 Динамика экстрасистолического сокращения миокарда пациентов с коморбидной патологией и с моновариантным течением ИБС.

Примечание. *- $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля

Заключение. Результаты исследования показали, что при проведении теста «Post-rest» наблюдалась потенциация инотропного ответа мышечных трабекул после периодов покоя, что свидетельствует о сохранении сократительного резерва миокарда пациентов с коморбидной патологией. При проведении «экстрасистолического теста» было обнаружено, что миокард пациентов с ИБС и СД2 типа обладал меньшей возбудимостью по сравнению с пациентами контрольной группы. Данный факт может свидетельствовать о меньшей вероятности возникновения эктопических очагов пейсмекерной активности рабочего миокарда у пациентов с коморбидной патологией. Результаты исследований позволяют говорить о том, что коморбидная патология сердца парадоксально позволяет сохранить функциональную активность систем ионного транспорта в кардиомиоцитах отвечающих в частности за работу СР как внутриклеточного депо Ca^{2+} .

Тезисы подготовлены в рамках темы фундаментальных исследований № АААА-А15-115123110026-3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koektuerk B., Aksoy M., Horlitz M., Bozdog-Turan I., Turan R.G. (2016) Role of diabetes in heart rhythm disorders. World Journal of Diabetes, no. 3, pp. 45-49.
2. Chengju T., Fadhel A., Caronda J M., Chun H. S., Shelby K., Jaipaul S., Keshore R. Bidasee I. (2014) Reactive carbonyl species and their roles in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} cycling defect in the diabetic heart. Heart failure reviews, no. 1. - pp. 101-112.
3. Pieske B., Sütterlin M., Schmidt-Schweda S., Minami K., Meyer M., Olschewski M., Holubarsch C., Just H., Hasenfuss G. (1996) Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy. Functional evidence for alterations in intracellular Ca^{2+} handling. Journal of Clinical Investigation, no. 3, - pp. 764-776.
4. Marengo F.D., Marquez M.T., Bonazzola P., Ponce-Hornos J.E. (1999) The heart extrasystole: an energetic approach. Am J Physiol Heart Circ Physiol., no. 276, pp. H309–H316.

**РЕПЕРТУАР КОСТНОМОЗГОВЫХ КЛЕТОК ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ЛИМФОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ У БОЛЬНЫХ
ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМОЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

А.В. Бузенкова, Р.Х. Мухамеджанов, Л.А. Таширева

Научный руководитель: д-р. мед. наук, ведущий научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии О.Е. Савельева

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук,

Россия, г. Томск, ул. Савиных, 12/1, 634028

E-mail: Angelina1993-21@mail.ru

**THE REPERTORY OF BONE MARROW PROGENITOR CELLS ASSOCIATED WITH
LYMPHOGENIC METASTASIS IN PATIENTS WITH INVASIVE CARCINOMA OF NO SPECIAL
TYPE**

A.V. Buzenkova, R.K. Mukhamedzhanov, L.A. Tashireva

Scientific Supervisor: Doctor of medical sciences, leading scientific worker of Department of General and
Molecular Pathology, O.E. Savel'eva

Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
Russia, Tomsk, Savinykh str., 12/1, 634028

E-mail: Angelina1993-21@mail.ru

Abstract. *The high mortality of patients with breast cancer is determined by metastatic disease. It is thought that the metastatic disease development associated with the repertory of bone marrow progenitor cells in breast cancer patients. In our study the correlation between the bone marrow progenitor cells presences in the tumor and blood of patients and the lymphogenic metastasis development was studied. The main clinical and pathological parameters of 24 patients with invasive breast carcinoma of non-specific type were analyzed. Endothelial progenitor cells, mesenchymal stem cells, macrophage precursors, hematopoietic progenitor cells were detected with specific antibodies against CD34, CD133, CD90, VEGFR1, CD11b, CD45, CD202 in the cell-rich fluid from frozen tumor. The amount of MCP-1 in the patients blood serum was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), at a wavelength of 450 nm. The cytokines concentration was calculated from the calibration plot. The program package Statistica 10.0. was used for statistical data processing. The high risk of lymphogenic metastasis in patients who didn't complete a neoadjuvant chemotherapy course was associated with the number of HPC, EPC and MSC in tumor and MCP-1 in blood.*

Введение. Преобладающей причиной смертности при раке молочной железы является метастазирование. Согласно современным представлениям наиболее точно механизмы метастазирования объясняет гипотеза S.Paget о «семенах и почве», в соответствии с которой локализация будущих метастазов определяется премеастатическими нишами. В этой связи изучение состава и функционирования опухолевых и премеастатических ниш особенно актуально.

Преметастатические и опухолевые ниши являются сложными системами, в которых различные клеточные популяции, а именно: рекрутируемые под влиянием опухолевых хемокинов костномозговые клетки предшественники, эндотелиальные клетки, фибробласты и клетки иммунной системы непрерывно взаимодействуют с компонентами внеклеточного матрикса и сосудистой сетью [1]. Кроме того, слаженное функционирование данной системы обеспечивает поддержание пролиферативной активности опухолевых клеток и активацию процессов неоангиогенеза. Все эти события способствуют прогрессии первичной опухоли, а также созданию благоприятных условий для отдаленного метастазирования [2].

Прямая идентификация преметастатических ниш в организме человека на сегодняшний день недоступна для исследователя. Однако существует мнение, согласно которому собственно опухолевая ниша и её вклад в развитие лимфогенного метастазирования являются отражением событий, происходящих в преметастатической нише [3].

Целью исследования являлось изучение состава опухолевой ниши, ассоциированной с развитием лимфогенных метастазов у больных инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы.

Материал для исследования. В исследование были включены 24 больных инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы T1-4N0-3M0 в возрасте от 29 до 70 лет. Из 24 пациентов предоперационное лечение получали 8 больных. У 11 пациентов были обнаружены лимфогенные метастазы, у 13 пациентов метастазы отсутствовали. Выполнялось морфологическое исследование материала, удаленного во время операции радикальной мастэктомии или секторальной резекции молочной железы. Материал фиксировался в 10% растворе нейтрального формалина. Проводка материала и изготовление гистологических препаратов осуществлялось по стандартной методике. Соотношение паренхиматозного и стромального компонентов новообразования оценивалось по трёхбалльной системе. Одним баллом (слабо выраженный фиброз) оценивали случаи, когда доля паренхиматозного компонента превышала 70%, двумя баллами (умеренно выраженный фиброз) – когда доля паренхиматозного компонента составляла 10–70%, тремя баллами (резко выраженный фиброз) – когда доля паренхиматозного компонента составляла менее 10%. В строме опухоли оценивалась выраженность гиалиноза и воспалительной инфильтрации по трех балльной системе (1 балл – слабо, 2 балла – умеренно, 3 балла – резко выражен). Из образцов свежзамороженного операционного опухолевого материала готовили суспензии, в которых с помощью специфических антител против CD34, CD133, CD90, VEGFR1, CD11b, CD45, CD202 выявляли эндотелиальные клетки-предшественники, мезенхимальные стволовые клетки, предшественники макрофагов, кроветворные клетки предшественники. Содержание MCP-1 в сыворотки крови пациентов оценивали с помощью твердофазного ИФА согласно протоколам производителей тест-систем на микропланшетном фотометре Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific) при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов вычисляли по калибровочной кривой. Для статистической обработки был использован пакет программ Statistica 10.0.

Результаты. Используя многофакторный метод обработки данных (метод логистической регрессии) был выявлен комплекс взаимоотношений между изучаемыми параметрами, который связан с высоким риском развития лимфогенных метастазов у пациенток с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы, не получавших неoadъювантную терапию. В математическую модель, характеризующую саму опухолевую нишу, вошли такие переменные, как: выраженность

фиброза стромы, количество гемопоэтических клеток предшественников (НРС), эндотелиальных клеток предшественников (ЕРС) и мезенхимальных стволовых клеток (MSC) в строме опухоли, а также уровень моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1) в крови. Степень достоверности данной модели составила $\chi^2 = 552,9$; $p = 0,0000$, чувствительность – 100%, специфичность – 100%. Наличие у пациентов лимфогенных метастазов можно рассматривать в качестве индикатора эффективности возникновения в опухолевой нише «семян» (клеток с повышенным метастатическим потенциалом), поскольку в лимфатических узлах, как полагают, премеастатическая ниша предуготована. Аналогичные события в премеастатической нише, вероятно, могли бы способствовать и развитию гематогенных метастазов.

Выводы. Мы показали, что опухолевая ниша представляет собой набор клеток (НРС, ЕРС, MSC), цитокины которых имеют отношение к развитию воспаления, включая рекрутирование моноцитов (MCP-1), а также секреции факторов, способствующих как росту опухоли, так и лимфогенному метастазированию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barcellos-Hoff, M., Lyden, D., Wang, T. (2013). The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis [Electronic version]. *Journal of Native Review Cancer*, no. 13, pp. 511-518.
2. Plaks, V., Kong, N., Werb, Z. (2015). The Cancer Stem Cell Niche: How Essential is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells [Electronic version]. *Journal of Cell Stem cell*, no.16, pp. 225-238.
3. Psaila, B., Lyden, D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil [Electronic version]. *Journal of Native Review Cancer*, no.9, pp. 285-293.

**ВЛИЯНИЕ НАНОСЕКУНДНЫХ МИКРОВОЛНОВЫХ ИМПУЛЬСОВ НА УРОВЕНЬ
КОРТИКОСТЕРОНА**

А.В. Васильев, А.А. Гороховский

Научный руководитель: доцент, канд. биол. наук И.Р.Князева

Сибирский государственный медицинский университет,

Россия, г.Томск, Московский тракт 6/2, 634050

E-mail: culackova.dunk@yandex.ru

**INFLUENCE OF NANOSECOND MICROWAVE PULSES ON THE LEVEL OF
CORTYCOSTERONE**

A.V. Vasilev, A.A. Gorokhovsky

Scientific Supervisor: assistant professor, candidate of biological sciences I.R.Knyazeva

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt 6/2, 634050

E-mail: culackova.dunk@yandex.ru

***Abstract.** This article describes experimental data on 30 nonlinear rats exposed to microwave radiation at frequencies 8, 13, 16 and 22 pulse per second (pps) in order to record corticosteron changes as an indicator of stress in rodent blood. During the experiment, it was found that the most significant increase is observed at frequencies 13, 16 pps and at 22, 8 pps a decrease and a slight increase in corticosteron were recorded respectively.*

Введение. Электромагнитное излучение разных диапазонов (включая микроволновый), будучи высоко интегрированным в жизнь оказывает воздействие на разные системы организма. Как следствие необходимо более детальное изучение воздействия электромагнитного излучения на организм человека. Особенно интенсивно в последние годы происходит увеличение уровня импульсного микроволнового излучения используемого в частности как носителя информации в системах связи. Это создает необходимость оценки возможного стрессогенного эффекта данного вида излучений, индикаторами которого могут вступать кортикостероиды (кортикостерон у грызунов, кортизол – у человека).

Цель данной работы заключалась в оценке содержания кортикостерона в сыворотке крови после облучения мышей наносекундными микроволновыми импульсами.

Материал и методы. Исследование выполнено на 30 белых мышах-самцах массой 20-25 г. Животные были разделены на пять групп по 6 мышей в каждой. В качестве контроля выступала группа ложнооблученных животных, которые подвергались всем манипуляциям, что и облученные, кроме включения источника излучения. Мыши облучались 5 суток ежедневно однократно (4000 импульсов за сеанс) с частотами повторения 8, 13, 16 и 22 имп./с. Источником микроволнового излучения служил лабораторный импульсный генератор на основе магнетрона МИ-505 (Россия, несущая частота 10 ГГц, выходная пиковая мощность 180 кВт, длительность импульсов 100 нс, средняя плотность потока мощности 1,5 мВт/см²). Выбор параметров воздействия основывался на ранее проведенных исследованиях [1]. Эффекты воздействия оценивались по уровню кортикостерона в сыворотке крови облученных и ложнооблученных мышей с использованием твердофазного иммуноферментного

«сэндвич» метода (ELISA).

Результаты. Проведенные эксперименты показали возможность стрессорного воздействия импульсного микроволнового излучения на организм мышей. Результаты воздействия продемонстрировали зависимость содержания кортикостерона от частоты повторения микроволновых импульсов (Рис.1). Так после воздействия с частотами повторения 13 и 16 имп./с уровень кортикостерона увеличивался в 3,3 и 2,5 раза соответственно по отношению к ложнооблученным животным, что указывает на развитие стресса у животных в результате облучения. В то же время облучение с частотой 22 имп./с приводило к значительному снижению содержания кортикостерона относительно уровня гормона у ложнооблученных животных. Воздействие микроволновыми импульсами с частотой 8 имп./с не оказывало статистически значимого влияния на уровень кортикостерона в сыворотке крови мышей (Рис.1).

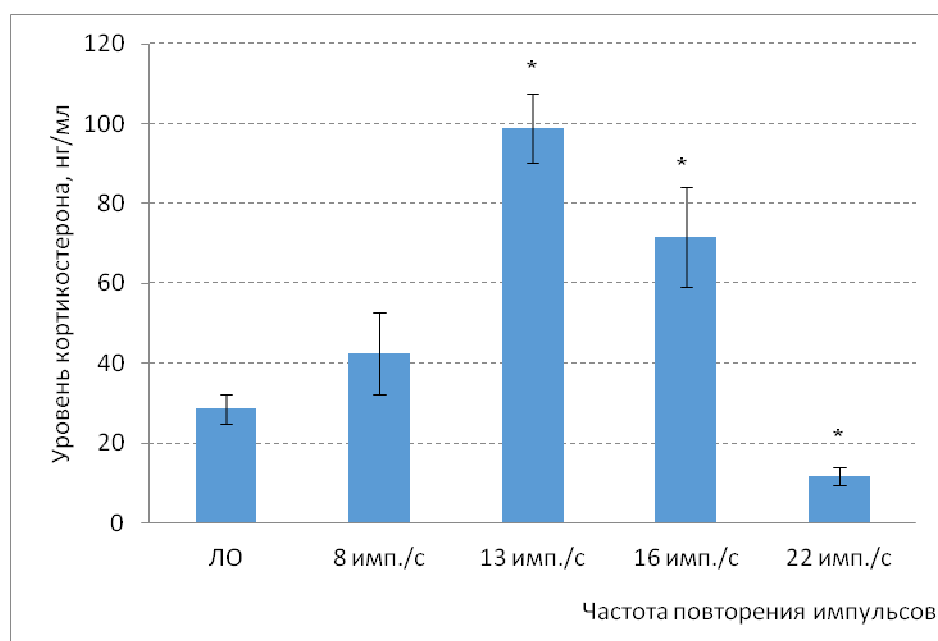


Рис.1 Изменение уровня кортикостерона в сыворотке крови мышей после облучения микроволновыми импульсами с разными частотами повторения

Заключение. Увеличение содержания кортикостерона указывает на развитие стресса у животных в результате воздействия микроволновыми импульсами с частотами повторения 13 и 16 имп./с. Облучение мышей с частотой 22 имп./с приводило к значительному снижению (почти в 2,5 раза) содержания кортикостерона у ложнооблученных животных, что могло означать еще большую степень стрессированности животных и переход в стадию истощения. Отсутствие эффекта после воздействия с частотой 8 имп./с могло означать либо отсутствие реакции организма на воздействие, либо развитие адаптации к излучению в ходе 5-дневного облучения с данными параметрами воздействующего фактора.

Анализ имеющихся в научной литературе и изложенных в эксперименте данных позволяют рассматривать микроволновое излучение в качестве фактора способного вызывать и изменять проявление стресса. Так терагерцовое излучение при частоте 129 ТГц обеспечивает снижение уровня кортикостерона в крови иммобилизованных крыс [2] и может выступать как гипотетический терапевтический инструмент. По другим данным определенные частоты (65, 73, 144, 167 ГГц) приводят

к резкому снижению уровня кортизола и нарушению структуры надпочечников (частота 73 ГГц) [3], тем самым снижая способность организма адекватно реагировать на стрессорные воздействия. Это может быть связано с возможной обратной отрицательной связью или таргетным воздействием на центральные и периферические эндокринные органы. Говоря о таргетности, следует отметить, что мозг является одной из ключевых мишеней при электромагнитном облучении. Подтверждением этого являются результаты экспериментов с воздействием микроволнового излучения интенсивностью 30 мВт/см² в течение 5 мин. Такое облучение в коре головного мозга уменьшало экспрессию генов цитохром С-оксидазы (мРНК COX I/II) дыхательной цепи митохондрий и как следствие угнетение синтеза АТФ [4]. АТФ же в центральных эндокринных органах может быть направлен на синтез тиреоидных, либериновых, статиновых гормонов, а в случае их угнетения будет наблюдаться падение общей реакции на стрессорный раздражитель в виде снижения уровня кортикостерона или кортизола, а так же инволюцией эндокринных желез.

В заключение необходимо отметить, что не только частота, мощность и тип электромагнитного излучения влияет на адаптационные возможности животных, но и сопутствующие экзогенные и эндогенные факторы различной природы. При этом общее снижение способности организма к адаптации наблюдается тогда, когда нет адекватной реакции на стресс, что приводит к переходу в стадию хронического стресса и истощения и, как следствие, к серьезным изменениям функционирования различных систем организма. Увеличение электромагнитной нагрузки на организм, связанное с внедрением в различных сферах человеческой деятельности, в том числе в медицине, технологий использующих электромагнитное излучение разных диапазонов, создает необходимость учета возможности воздействия этих излучений в гигиенической и экологической практике, чтобы полностью устранить или минимизировать нежелательные последствия и/или создать оптимальные условия для достижения максимального терапевтического эффекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knyazeva I.R., Bolshakov M.A., Ivanov V.V., Zharkova L.P., Kereya A.V., Kutenkov O.P., Rostov V.V. Response of Mice Liver Mitochondria to Repetitive Pulsed Microwaves and X-rays // Известия ВУЗов Физика. – 2012. – Т. 55. – № 10/3. – С. 194–198.
2. Киричук В.Ф., Цымбал А.А. Закономерности и механизмы биологического действия электромагнитных волн терагерцевого диапазона: монография. – Саратов: Изд-во Сарат. гос. мед. ун-та, 2015. – 123с.
3. Полина Ю.В., Родзаевская Е.Б., Наумова Л.И. Уровень кортизола и морфология надпочечников под воздействием низкоинтенсивного электромагнитного излучения и при стрессе // Саратовский научно медицинский журнал – 2008. - №1 - С. 127–130.
4. Hao, Y., Zhao, L., & Peng, R. (2015). Effects of microwave radiation on brain energy metabolism and related mechanisms [Electronic version]. Military Medical Research, no. 2:4, pp. 1-8.

ГЕН ФЛАВОНОИД 3', 5'-ГИДРОКСИЛАЗЫ ЯЧМЕНЯ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ

А.В. Вихорев¹, К.В. Стрыгина²

Научный руководитель: к.б.н. О.Ю. Шоева²

¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия,

г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090

²Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Россия,

г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, 630090

E-mail: vihorev97@mail.ru

THE GENE FLAVONOID 3', 5'-HYDROXYLASE OF BARLEY AS A TARGET FOR EDITING

A.V. Vikhorev¹, K.V. Strygina²

Scientific Supervisor: O.Y. Shoeva, PhD²

¹Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogova str., 2, 630090

²Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Russia, Novosibirsk, Akademika Lavrentieva Ave., 10, 630090

E-mail: vihorev97@mail.ru

Abstract. *Secondary metabolites anthocyanins are synthesized by many higher plants including an important agricultural crop barley (*Hordeum vulgare* L.). The study of genes involved in the synthesis of anthocyanins is actual because of health benefits of these compounds. One of the least studied structural genes in this metabolic pathway are genes of cytochrome P450 family. The aim of this study was to identify, compare, and analyze duplicated paralogous copies of cytochrome P450-encoding flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes in a barley genome. We identified four F3'5'H gene copies in the barley genome using a database for not annotated sequences using BLAST. The available sequences have cytochrome P450 domain. One of the copies carries a frame-shift mutation damaging the functional P450 domain, which could lead to changes in gene function. The transcription activity of the detected genes in various parts of plant varied among the copies. It is assumed that the maintenance of these duplicated genes is probably related to their specialization – all copies of F3'5'H can participate in the synthesis of anthocyanin compounds in different parts of the plant.*

Введение. Вторичные метаболиты антоцианы синтезируются многими высшими растениями, включая важную сельскохозяйственную культуру ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.) [1]. Ввиду пользы для здоровья данных соединений, изучение генов, вовлечённых в синтез антоцианов, является актуальной задачей. Одним из малоизученных структурных генов в данном метаболическом пути является флавоноид 3', 5'-гидроксилаза. Данный ген, принадлежащий к большому семейству генов цитохром P450, является необходимым компонентом в пути биосинтеза голубых и фиолетовых антоциановых пигментов [2]. Ранее было показано наличие у ячменя одной копии данного гена, тканеспецифично экспрессирующейся в алейроновом слое [3]. Цель данной работы – идентификация и функциональный анализ генов F3'5'H ячменя. На основе полученных данных о локализации, структурно-функциональной организации и регуляции данных генов в дальнейшем планируется разработать генетическую конструкцию для редактирования гена F3'5'H ячменя с помощью системы CRISPR-Cas9 с целью получения сортов с новыми хозяйственно-ценными признаками.

Материалы и методы исследования. Для поиска гомологичных последовательностей гена *F3'5'H* ячменя (GenBank MF679160) использовали базу данных неаннотированных геномных последовательностей IPK Barley BLAST Server (http://webblast.ipkgatersleben.de/barley_ibsc/). Для аннотирования выявленных последовательностей использовали программу FGENESH+. Выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей было осуществлено с использованием MULTALIN v5.4.1. *In silico* анализ промотора был произведен с помощью PLACE. Филогенетический анализ был произведен в программе MEGA v6.06 с использованием алгоритма UPGMA. Для анализа аминокислотных последовательностей использовали сервис InterPro. В качестве растительного материала использовали почти изогенные линии Bowman (Таблица 1), предоставленные IPK GenBank (Гатерслебен, Германия). Растения выращивались в теплицах ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия) при 12-часовом световом дне при температуре 20-25°C. РНК из алейронового слоя была выделена с использованием набора Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Германия). РНК из перикарпов, лемм и стеблей (с листовыми оболочками) была выделена с помощью ZR Plant RNA MiniPrep™ (Zymo Research, США). Полученная РНК была обработана Rnase-free Dnase set (QIAGEN, Германия). По матрице РНК была синтезирована одноцепочечная кДНК с использованием RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Амплификацию геномной ДНК и кДНК проводили с помощью ПЦР. Дизайн праймеров был выполнен с использованием программы OLIGO7. Продукты ПЦР разделяли на агарозном геле. Амплифицированные фрагменты выделяли из агарозного геля с использованием набора DNA Clean kit (Цитокин, Санкт-Петербург, Россия). Секвенирование ДНК проводилось на базе ЦКП «Геномика» ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Таблица 1

Фенотипические характеристики использованных линий ячменя

Название линии	Фенотипические характеристики		
	Алейроновый слой	Перикарп и лемма	Стебель
BW (Bowman)	Неокрашенный	Неокрашенный	Неокрашенный
BA (Blue aleurone)	Голубой	Неокрашенный	Неокрашенный
PLP (Purple lemma and pericarp)	Неокрашенный	Фиолетовый	Фиолетовый

Результаты. Были идентифицированы четыре копии гена *F3'5'H* (включая ранее выделенный ген *F3'5'H-1*): одна в четвертой хромосоме (*F3'5'H-1*), две в шестой хромосоме (*F3'5'H-2* и *F3'5'H-3*) и одна в седьмой хромосоме (*F3'5'H-4*) (рис. 1А). Почти все проанализированные последовательности генов *F3'5'H* одно- и двудольных организмов (рис. 1А) несут в своем составе два экзона. Исключением является ген *F3'5'H-1* ячменя – в его составе было обнаружено три экзона. Второй интрон у *F3'5'H-1*, вероятно, появился на более позднем этапе эволюции после дивергенции дублированных копий. В ходе анализа промоторов генов было выявлено множество мотивов, отвечающих за светозависимую активацию, что характерно для генов, вовлеченных в биосинтез флавоноидных соединений. Нами было показано, что все выявленные гены имеют домен, характерный для семейства гемсодержащих монооксигеназ, – Cytochrome P450, E-class, group I (IPR002401). Члены данного семейства участвуют в метаболизме физиологически активных соединений, в том числе у растений. Однако одна из копий, обозначенная нами

F3'5'H-3, несёт мутацию сдвига рамки считывания, нарушающую функциональный домен P450 (рис. 1б). С помощью разработанных нами и апробированных ген-специфичных маркеров в ходе анализа *in vitro* с помощью ОТ-ПЦР была проверена экспрессия данных генов на образцах кДНК, полученных из контрастных по окраске тканей почти изогенных линий Bowman (Таблица 1). Было показано, что тканеспецифичная экспрессия характерна только для *F3'5'H-1* (алеироновый слой зерновки).

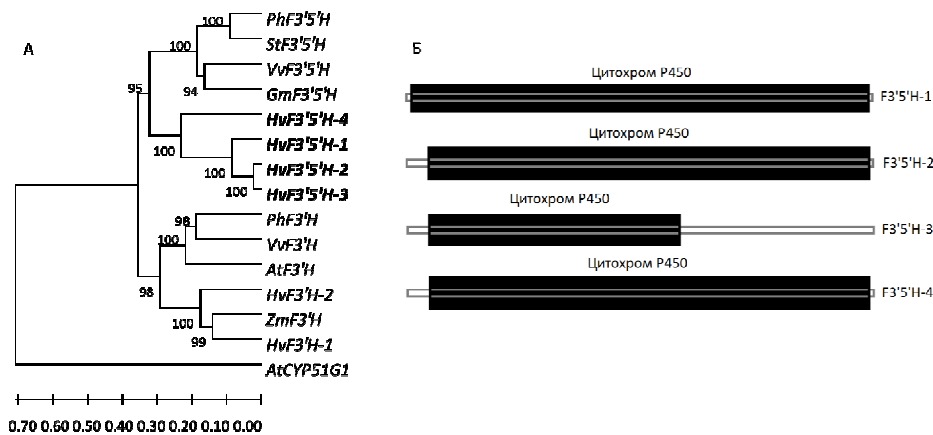


Рис. 1. Последовательности *F3'5'H*, выявленные в геноме ячменя. А) Филогенетический анализ последовательностей генов *F3'5'H* ячменя. Построение дерева на основе нуклеотидных последовательностей генов. MEGA 6.06, метод NJ. Б) Структурная организация генов *F3'5'H* ячменя. Чёрным цветом выделен функциональный домен цитохром P450

Заключение. Таким образом, в рамках настоящего исследования с помощью базы данных неанотированных последовательностей ячменя были идентифицированы последовательности генов биосинтеза антоцианов *F3'5'H*. С помощью разработанных праймеров на материале почти изогенных линий сорта Bowman была исследована экспрессия этих генов. Предполагается, что поддержание функций данных дублированных генов, вероятно, связано с их специализацией – все копии *F3'5'H* могут участвовать в синтезе флавоноидных соединений антоцианов в разных частях растения. Данная работа может позволить проводить ускоренную селекцию сортов продовольственного и кормового ячменя с повышенной пищевой ценностью зерна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adzhieva V.F., Babak O.G., Shoeva O.Y., Kilchevsky A.V., Khlestkina E.K. (2016). Molecular genetic mechanisms of the development of fruit and seed coloration in plants. Russian Journal of Genetics: Applied Research, no. 5, pp. 537-552.
2. Tanaka Y., Brugliera F. (2013). Flower colour and cytochromes P450. Phil. Trans. R. Soc. B, no. 1612, pp. 20120432.
3. Strygina K.V., Börner A., Khlestkina E.K. (2017). Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone. BMC plant biology, no. 1, pp. 184.

**IN SILICO ПОСТРОЕНИЕ СЕТИ ИЗ ГЕНОВ- МОДИФИКАТОРОВ ХОРЕИ ГЕНТИНГТОНА,
ОБНАРУЖЕННЫХ ПРИ ПОЛНОГЕНОМНОМ СКАНИРОВАНИИ**Д.Е. Гомбоева

Научный руководитель: академик РАН, д.м.н., В.П. Пузырев

НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН,
Россия, г. Томск, пер. Кооперативный 5, 634009E- mail: gombo-d@mail.ru**IN SILICO RECONSTRUCTION OF GENES-MODIFIERS NET OF HUNTINGTON DISEASE
REVEALED IN GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY**D.E. Gomboeva

Scientific Supervisor: V.P. Puzyrev, MD, PhD, Academician

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of
Sciences, Russia, Tomsk, 5 Kooperativny Street, 634050E-mail: gombo-d@mail.ru

Abstract. *Huntington disease is inherited neurodegenerative disease, which affects the striatum (caudate nucleus and putamen). The cause of HD is an expansion CAG-repeats in exon 1 in HTT gene (4p16.3), which encodes protein called huntingtin. This mutation leads to the elongated polyglutamine tract of huntingtin, causing the loss-of-function of the protein, which in normal conditions play role in vesicular transport, cell division, mitochondrial transport, transcription regulation and neurogenesis. Epidemiological studies have shown the decreasing of cancer risk for patients with HD. The distinct molecular mechanism which leads to such a phenomenon is still unknown. Particular studies have shown what the presence of mutant huntingtin, on contrary, is associated with acceleration of carcinogenesis in mouse model of HD, while the normal huntingtin inhibits the development of cancer. We suggest what the phenomenon of inverse comorbidity of HD with oncological diseases might be cause of the effects of other molecular-genetic mechanisms, particularly cause of genes-modifiers of HD. There are 800 putative genes which take part in the modification of HD. We have taken free access data from genome- wide association study of genetic variants associated with HD progression of HD patients from Europe in order to perform a functional annotation of these genes, using a special tool HDNetDB, which enables to reconstruct genetic networks and to provide a functional analysis.*

Актуальность. Хорея Гентингтона (ХГ) является наследственным нейродегенеративным заболеванием, преимущественно поражающим нейроны полосатого тела – хвостатое ядро и скорлупу. Заболевание характеризуется триадой клинических проявлений: нарушением когнитивной сферы (деменция, проявляющаяся в самом начале), моторными нарушениями (хореические гиперкинезы) и психическими нарушениями. Возраст манифестации ХГ варьирует в среднем от 35 до 50 лет, ювенильные формы ХГ проявляются на 1-2 десятке жизни. Этиология ХГ заключается в увеличении числа CAG-повторов в гене *HTT*, локализуемом на коротком плече 4-ой хромосомы (4p16.3). Продуктом гена является белок гентингтин, участвующий во многих внутриклеточных процессах, включая везикулярный транспорт, митохондриальный транспорт, регуляцию транскрипции, нейрогенез и

энергетический обмен. Экспансия тринуклеотидных CAG-повторов в гене *HTT* свыше 27 (число которых в норме варьирует от 7 до 17-20) приводит к увеличению длины полиглютаминового тракта белкового продукта, изменению термодинамических свойств и появлению токсичных свойств у мутантного белка.

Согласно эпидемиологическим исследованиям, больные ХГ имеют более низкий риск заболевания онкологическими заболеваниями по сравнению с популяцией в целом [1-3]. Точные молекулярно-генетические механизмы, объясняющие этот феномен, пока не известны. Однако, существуют данные, указывающие на наличие у белка гентингина протективных свойств в отношении канцерогенеза [4], что не согласуется с фактом присутствия у больных ХГ в организме мутантного белка и снижения риска возникновения рака. Но учитывая то, что в наследуемость возраста начала ХГ количество CAG-повторов в гене *HTT* вносит около 40% [5], а остальные 60% - другие генетические факторы, или гены-модификаторы, можно предположить вовлеченность последних в формирование онкорезистентного фенотипа больных ХГ. Таким образом, при изучении молекулярно-генетических механизмов, обуславливающих так называемую обратную коморбидность ХГ и рака, одним из подходов может быть поиск общих сигнальных путей при помощи методов биоинформатики и системной биологии.

Цель исследования. При помощи ресурса HDNetDB (<http://hdnetdb.sysbiolab.eu/>) реконструировать сеть взаимодействий, состоящую из генов-модификаторов ХГ, обнаруженных при полногеномном исследовании, и выявить наиболее значимые пути, в которые они вовлечены.

Материалы и методы исследования. Список генов-модификаторов ХГ был изъят из ресурса “GWAS Catalog” (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>). Затем производилась фильтрация генов: из анализа были удалены некодирующие варианты, межгенные промежутки ($n=8$), списки генов приводились в соответствии с номенклатурой ENS с применением базы данных EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/>). Данные представляли собой результаты полногеномного исследования генов-модификаторов прогрессии ХГ, произведенного Moss et al. в 2017 [6] на платформе Illumina. Оно включило в себя 1989 больных ХГ европейского происхождения. В онлайн-ресурсе HDNetDB (<http://hdnetdb.sysbiolab.eu/>) [7] была произведена реконструкция сети генов-модификаторов ХГ и выполнен KEGG-анализ.

Результаты. Автоматически реконструированная генная сеть состояла из 13 центральных узлов, окруженных элементами, имеющими с ними белок-белковые взаимодействия, а остальные запрашиваемые 21 – в нее не вошли, т.к. не имели общих взаимодействий. Для каждого запрашиваемого гена отображались взаимодействующие белки/гены, которые в дальнейшем также анализировались. Между генами не было выявлено прямых взаимодействий, однако присутствовали опосредованные взаимодействия. В результате KEGG-анализа идентифицированы значимые биологические пути, в которые вовлечены гены-модификаторы ХГ. Среди них можно выделить процессы окислительного фосфорилирования ($p=1.60E-6$, $FDR=3.14E-5$); гомологичной рекомбинации ($p=3.29E-5$, $FDR=5.54E-4$); репарации ошибочно спаренных оснований ($p=8.58-10$, $FDR=5.06E-8$); FcγR-опосредованный фагоцитоз ($p=0.00675$, $FDR=0.06452$); сокращение сердечной мышцы ($p=5.91E-5$, $FDR=8.72E-4$), цитотоксичность, опосредованная NK-клетками ($p=0.03703$, $FDR=0.18135$); сигнальный путь T-клеточного рецептора ($p=0.03118$, $FDR=0.18135$). Отдельные кластеры генов были ассоциированы с развитием ХГ ($p=4.47E-9$, $FDR=1.36E-7$), болезнью Паркинсона ($p=4.63E-9$, $FDR=1.36E-7$) и болезнью Альцгеймера ($p=1.09E-6$, $FDR=2.59E-5$). Кроме того, такие гены реконструированной сети, как: *CASP3*, *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *CTBP2*, *HSP90AA1*, *HSP90AB1*, *RBI*, *TP53*, *PLCG1*, *FGFR1*, *STAT3*, *CTNBN1*, *CDH1*, *STK4*, были

вовлечены в сигнальные пути развития рака ($p=0.00233$, $FDR=0.06511$). Также в геномной сети присутствовали гены, причастные к раку щитовидной железы: *TP53*, *CTNNB1*, *CDH1* ($p=0.02645$, $FDR=0.17162$); раку эндометрия: *MLH1*, *CTNNB1*, *CDH1*, *TP53* ($p=0.03585$, $FDR=0.18954$) и немелкоклеточному раку легких: *STK4*, *RBI*, *TP53*, *PLCG1* ($p=0.03922$, $FDR=0.18135$). Нужно отметить, что роль гена *TP53* была отмечена как в процессе канцерогенеза, так и нейродегенерации при ХГ [8]. Белок онкосупрессор p53 является возможным геном-кандидатом молекулярной основы обратной коморбидности ХГ и рака. Перспективными мишенями для дальнейшего изучения являются также гены репарации ДНК (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*). В настоящее время обсуждается теория, подразумевающая репарацию ДНК одним из связующих звеньев между процессами нейродегенерации и канцерогенеза [9].

Заключение. Таким образом, поиск молекулярно-генетических механизмов обратной коморбидности ХГ и канцерогенеза, может быть направлен в сторону изучения белков, опосредованно взаимодействующих с продуктами генов-модификаторов ХГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sørensen, S.A., Fenger, K., Olsen, J.H. (1999). Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease an apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? *Cancer*, Vol. 86, no. 7, pp. 1342–1346.
2. Ji, J., Sundquist, K., Sundquist, J. (2012). Cancer incidence in patients with polyglutamine diseases: a population-based study in Sweden. *Lancet Oncology*, Vol. 13, pp. 642–648.
3. Coarelli, G., Diallo, A., Thion, M.S. et al. (2017). Low cancer prevalence in polyglutamine expansion diseases. *Neurology*, Vol. 88, no. 12, pp. 1114–1119.
4. Thion, M.S., McGuire J.R., Sousa, C.M. et al. (2015). Unraveling the role of huntingtin in breast cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 107, no. 10, djv208.
5. Wexler, N.S., Lorimer, J., Porter, J. et al. (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci USA*, no. 101, pp. 3498–3503.
6. Moss, D.J.H., Pardiñas, A.F., Langbehn, D. et al. (2017). Identification of genetic variants associated with Huntington's disease progression: a genome-wide association study. *The Lancet Neurology*, Vol. 16, no. 9, pp. 701–711.
7. Kalathur, R.K.R., Pinto, J.P., Sahoo, B., Chaurasia, G., Futschik, M.E. (2017). HDNetDB: a molecular interaction database for network-oriented investigations into Huntington's disease. *Scientific Reports*, Vol. 7, no. 1, pp. 1–12.
8. Tidball, A.M., Neely, M.D., Chamberlin, R. et al. (2016). Genomic instability associated with p53 knockdown in the generation of Huntington's disease human induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*, Vol. 11, no.3, pp. 1–16.
9. Liakos, A., Lavigne, M.D., Foustieri, M. (2017). Nucleotide excision repair: from neurodegeneration to cancer. *Personalised Medicine, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 1007, pp. 17–39.

**ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ ЭКСТРАСИСТОЛИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА МИОКАРД
КРЫС 4 И 24 МЕСЯЧНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ПОСТИНФАРКТНОГО
КАРДИОСКЛЕРОЗА**

А.А. Гороховский, А.В. Васильев

Научный руководитель: науч. сотр., канд. мед. наук Т.Ю. Реброва

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук,
Россия, г. Томск, Киевская улица, 111А, 634012

E-mail: alegorohovs@yandex.ru

**PECULIARITIES OF EKSTRASISTOLIEI EFFECTS ON THE MYOCARDIUM OF RATS 4 AND 24
MONTHS OF AGE IN TERMS OF POST-INFARCTION CARDIOSCLEROSIS**

A.A. Gorokhovsky, A.V. Vasilev

Scientific Supervisor: research officer, candidate of medical sciences T.Y. Rebrova

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,
Russia, Tomsk, Kievskaya st., 111A, 634012

E-mail: alegorohovs@yandex.ru

***Abstract.** The following article describes the study of peculiarities of ekstrasistoliei effects on the myocardium of rats 4 and 24 month of age in terms of post-infarction cardiosclerosis. During the experiment we used rats of different ages artificially subjected to occlusion of the coronary artery. Experimentally it was detected an increase in the excitability of the heart muscle in the rats of older age and disability of sarcoplasmic reticulum to accumulate calcium was predominantly in young animals.*

Введение. По данным медицинской статистики РФ хроническая сердечная недостаточность (ХСН) среди населения составляет 7%. Среди лиц старшей возрастной группы распространенность ХСН возрастает до 70 %. Это нужно учитывать, так как данная нозология является одним из основных факторов, приводящих к снижению качества жизни, гиподинамии, инвалидности и в состоянии декомпенсации требует обязательной госпитализации, так как может привести к смерти в результате угнетения насосной функции сердца. Именно поэтому до 1990-х большинство пациентов погибали в течении 5 лет с момента постановки диагноза. Современная терапия позволила снизить количество негативных прогнозов течения ХСН, но не отменила ее лидерства в структуре смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [1].

Цель нашей работы заключалась в исследовании особенности инотропных реакций миокарда крыс с постинфарктным кардиосклерозом на изменение внутриклеточного гомеостаза ионов кальция при воздействиями внеочередными стимулами.

Материалы и методы исследования. Исследования были выполнены на белых крысах-самцах линии Wistar, возрастом 4 и 24 месяцев, в каждой возрастной группе были выделены контрольная и опытная подгруппы. Животным опытных подгрупп моделировали инфаркт миокарда при помощи коронароокклюзии путем наложения лигатуры в области верхней трети левой нисходящей коронарной

артерии. Операционную рану зашивали и животных содержали в стандартных условиях вивария в течение 45 суток. По истечении этого срока у животных формировался постинфарктный кардиосклероз (ПИКС). Контролем в нашем исследовании служили животные, которым была выполнена ложная операция без коронароокклюзии.

Сократительную функцию миокарда оценивали по изменению инотропного ответа изолированно-перфузируемых папиллярных мышц левого желудочка крыс. Перфузию мышц осуществляли в термостабилизированной проточной камере при 36,5°C оксигенированным (O_2 – 95%, CO_2 – 5%) раствором Кребса-Хензелья [2]. Электрическую стимуляцию мышц осуществляли электрическими импульсами прямоугольной формы длительностью 5 мс, при базовой частоте импульсов 0,5 Гц. Инотропный ответ папиллярных мышц измеряли в изометрическом режиме, а его регистрацию и обработку проводили на компьютере с использованием программы MuscleData (Standard System for Muscle Investigation, Heidelberg, Германия). Возбудимость сарколеммы оценивали по способности мышцы отвечать на внеочередной стимулирующий импульс [3]. Способность саркоплазматического ретикулума (СПР) аккумулировать ионы Ca^{2+} оценивали по изменению амплитуды постэкстрасистолического сокращения (рис. 1).

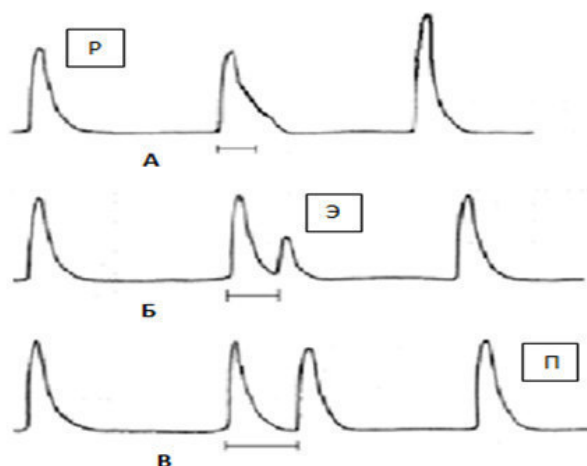


Рис.1. Типичный вид механограмм после выполнения экстрасистолического теста

Примечание: А – экстрасистолическое воздействие с интервалом 0.2 с.; Б - экстрасистолическое воздействие с интервалом 0.5 с.; В - экстрасистолическое воздействие с интервалом 1.0 с.; Р - регулярный цикл; Э - экстрасистола; П - постэкстрасистолический цикл

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ Statistika 6.0. Достоверность полученных данных оценивали с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Проведенные электрофизиологические исследования показали, что папиллярные мышцы из сердец животных 4 месяца с ПИКС отвечают внеочередным сокращением на экстрасистолическое воздействие, нанесенное через 0,25 с от начала регулярного цикла. При экстрасистолических интервалах длительностью 0,75 с и более, у животных 4 месячного возраста с ПИКС инотропный ответ статистически значимо начинал превышать аналогичные значения интактных

животных. У 24 месячных животных с ПИКС экстрасистолический ответ был получен при нанесении внеочередного стимула при минимальном интервале нанесения внеочередного стимула 0,20 с. Для старых животных было характерно, что при нанесении внеочередного стимулирующего импульса с интервалом больше 0,225 с., амплитуда экстрасистолических ответов всегда была меньше чем у папиллярных мышц интактных животных этой возрастной группы. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что у молодых животных формирование ПИКС приводит к снижению возбудимости сарколеммальной мембраны, в то время как для сарколеммы кардиомиоцитов старых животных с ПИКС характерна повышенная возбудимость.

Известно, что внеочередной импульс электрической стимуляции, приходящийся на фазу относительной рефрактерности потенциала действия, инициирует поступление дополнительных ионов кальция из внеклеточного пространства в миоплазму [3]. Эти ионы депонируются в СПР и участвуют в первом постэкстрасистолическом цикле сокращение-расслабление. Функциональным проявлением этого явления служит эффект постэкстрасистолической потенциации инотропного ответа сердечной мышцы. Увеличение постэкстрасистолического инотропного ответа отражает способность СПР кардиомиоцитов, до определенной степени, скомпенсировать повышение возбудимости их сарколеммы.

Анализ постэкстрасистолических сокращений показал, что у 4-месячных животных с ПИКС эффект постэкстрасистолической потенциации при интервалах 0,2 с и 0,225 с был достоверно ниже, чем в группе интактных животных этого возраста. Наибольшее изменение этого показателя составило 9 % при 0,25 с экстрасистолическом интервале. В группе 24-х месячных крыс в условиях ПИКС постэкстрасистолическая потенциация инотропного ответа мышечных полосок из папиллярных мышц практически не отличалась от таковой у интактных животных того же возраста. При этом в диапазоне 0,20-0,25 с амплитуда постэкстрасистолических сокращений папиллярных мышц в группе 24 месячных животных достоверно превышала аналогичный показатель у молодых животных.

Выводы. Постинфарктное ремоделирование миокарда носит выраженный возраст-зависимый характер. Миокард животных возрастом 24 месяца в условиях экспериментального постинфарктного кардиосклероза характеризуется повышением возбудимости, тогда как в миокарде молодых животных отмечается нарушение способности саркоплазматического ретикулула аккумулировать и удерживать ионы кальция.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ponikowski P., Voors A.A., Anker S.D. et al. (2016). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*, no. 37, pp. 2129-2200. Retrieved May 20, 2016, from <https://academic.oup.com/eurheartj/article/37/27/2129/1748921>
2. Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С. Активность перекисного окисления липидов и функциональное состояние миокарда при ремоделировании сердца крыс после экспериментального инфаркта // *Кардиология*. - 2007. - Т. 47. - № 6. - С. 41-45.
3. Yano M., Ikeda Y., Matsuzaki M. (2005). Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure. *Journal Clin. Invest*, no. 115(3), pp. 556-564. Retrieved March 1, 2016, from <https://www.jci.org/articles/view/24159>

**ВКЛАД ЭСТРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА АЛЬФА В МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К
ЭНДОКРИННОЙ ТЕРАПИИ ТАМОКСИФЕНОМ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Т.А. Дронова^{1,2}, С.В. Паталяк¹

Научные руководители: к.м.н. Н.Н. Бабышкина, профессор, д.б.н. В.Н. Стегний

¹НИИ онкологии Томского НИМЦ,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный 5, 634050

²Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: tanyadronova@mail.ru

**IMPACT OF ESTROGEN RECEPTOR ALPHA ON THE TAMOXIFEN RESISTANCE IN BREAST
CANCER PATIENTS**

T.A. Dronova^{1,2}, S.V. Patalyak¹

Scientific Supervisors: N.N. Babyshkina, Ph.D., V.N. Stegnyy, Ph.D.

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,

Russia, Tomsk, Kooperativny Street, 5, 634050

²Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina av., 36, 634050

E-mail: tanyadronova@mail.ru

Abstract. Genetic aberrations and changes in the activity of estrogen receptors alpha (ER α) play an important role in the endocrine sensitivity. The aim of this study was to examine the relationship between the ESR1 expression level, its polymorphic variants, and the distribution pattern of ER α expression with the prognosis and efficacy of tamoxifen treatment in breast cancer patients. Our data suggest that the ESR1 expression level, SNPs in the ESR1 gene and the distribution pattern of ER α expression can be a potential molecular marker of tamoxifen resistance in breast cancer patients.

Актуальность. Содержание эстрогеновых рецепторов в опухоли у больных раком молочной железы (РМЖ) является одним из основных критериев определения её чувствительности/резистентности к гормональной терапии [1,2]. В качестве возможных механизмов неэффективности гормонотерапии рассматриваются генетические aberrации и изменение активности эстрогеновых рецепторов альфа (ER α) [3,4]. Имеются убедительные доказательства того, что уровень экспрессии ER α связан с ответом опухоли на терапию тамоксифеном [5,6]. Однако вклад точечных мутаций гена *ESR1* в локусах rs2228480, rs2077647, rs1801132, rs3798577 и характера распределения ER α в механизмы развития резистентности к терапии тамоксифеном остается не изученным.

Цель работы: оценить взаимосвязь уровня экспрессии *ESR1*, его полиморфных вариантов и характера распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли с прогнозом и эффективностью терапии тамоксифеном у больных раком молочной железы.

Материалы и методы. В настоящее исследование включены 122 пациентки с операбельным раком молочной железы, T₁₋₄N₀₋₃M₀. Всем пациенткам выполнено радикальное хирургическое лечение, а также лучевая и химиотерапия по показаниям. Обязательным компонентом адъювантного лечения

больных являлся прием тамоксифена в течение 5 лет (стандартная дозировка – 20 мг/сутки). Неoadьювантное лечение не проводилось. Для определения молекулярного подтипа РМЖ использована классическая панель из иммуногистохимических маркеров: ER, PR, HER2 и Ki-67. Рецептор-положительные опухоли с негативной экспрессией HER2 и пролиферативной активностью Ki-67 менее 20% относили к люминальному А подтипу РМЖ. К люминальному В типу – опухоли с позитивной и негативной экспрессией HER2, положительной экспрессией рецепторов к эстрогенам и прогестерону и высоким уровнем пролиферативной активности ($Ki-67 \geq 20\%$).

На основе отдаленных результатов лечения (наличие гематогенного метастазирования/рецидива или отсутствие прогрессирования заболевания) сформировано две группы больных. Первая – тамоксифен-резистентная (пациентки с прогрессированием), вторая – тамоксифен-чувствительная (больные без признаков прогрессирования). Материалом для исследования служили образцы опухолевой и прилежащей нормальной ткани. Тотальная РНК получена с помощью наборов RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Германия). Уровень экспрессии гена *ESR1* оценен методом количественной обратной-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) по технологии TaqMan. ДНК из опухолевых образцов была выделена путем депарафинизации срезов с помощью наборов QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Германия). Анализ полиморфных вариантов гена *ESR1* (rs2228480, rs2077647, rs1801132, rs3798577) изучен при помощи ПЦР в режиме реального времени. Характер распределения ER α оценивали иммуногистохимическим методом. Общая выживаемость больных РМЖ анализировалась с помощью кривых Каплана-Майера и теста логарифма рангов. Для анализа наличия или отсутствия связи между исследуемыми маркерами использовали корреляционный анализ Спирмена. Статистическую обработку проводили с помощью программы “STATISTICA 7.0”. Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$.

Результаты. Изучена взаимосвязь уровня экспрессии *ESR1*, его полиморфных вариантов и характера распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли с прогнозом и эффективностью терапии тамоксифеном в общей группе больных РМЖ и в группах пациенток с люминальным А и В подтипом опухоли. В результате исследования установлено, что уровень экспрессии гена *ESR1* был значимо выше в тамоксифен-чувствительной группе больных ($35,64 \pm 16,39$), по сравнению с тамоксифен-резистентными пациентками вне зависимости от молекулярного подтипа опухоли ($0,87 \pm 0,39$; $p = 0,041$).

Показано, что носительство минорного генотипа *ESR1* 2014AA (rs2228480) значимо ассоциировано с прогрессированием заболевания на фоне приема тамоксифена как в общей группе больных РМЖ, так и у пациенток с люминальным В подтипом ($p = 0,013$ и $p = 0,017$ соответственно). Установлена положительная корреляционная связь между полиморфными локусами гена *ESR1* (rs1801132 и rs2077647) в общей группе больных РМЖ ($r = 0,199$; $p = 0,029$).

Гетерогенный характер распределения ER α наблюдался в 86,5% у тамоксифен-резистентной группы больных по сравнению с 58,3% среди пациенток тамоксифен-чувствительной группы ($p = 0,003$). Выявлено, что полиморфный локус rs2228480 гена *ESR1* корреляционно связан с характером распределения ER α в опухоли ($r = 0,349$; $p = 0,017$).

Анализ выживаемости в общей группе больных РМЖ показал, что пациентки с гетерогенным распределением ER α в опухоли имели худшие показатели выживаемости, чем больные с гомогенным распределением ER α ($p = 0,009$). Показатели выживаемости у больных с минорным генотипом гена *ESR1*

2014AA (rs2228480) были значимо ниже по сравнению с показателями у пациенток с мажорным генотипом ($p = 0,040$). У пациенток с мажорным генотипом гена *ESR1* (rs3798577) наблюдалось существенное преимущество в показателях общей выживаемости по сравнению с гетерозиготами по данному полиморфному локусу ($p = 0,014$).

Заключение. Представленные результаты позволяют рассматривать уровень экспрессии *ESR1*, его полиморфные локусы, а также характер распределения в опухолевой ткани ER α в качестве потенциальных маркеров чувствительности и резистентности к терапии тамоксифеном.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-29-06037 офи_м «Геномные механизмы регуляции опухолевой прогрессии рака молочной железы в условиях лекарственной терапии».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красильников М.А. Современные подходы к изучению механизма эстроген-независимого роста опухолей молочной железы // Вопросы онкологии. – 2004. – Т. 4. - № 50. – С. 399-405.
2. Clarke, R., Liu, M., Bouker, K., Gu, Z., Lee, R.Y., Zhu, Y., Skaar, T.C., Gomez, B., O'Brien, K., Wang, Y., Hilakivi-Clarke, L.A. (2003) Antiestrogen resistance in breastcancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene*, no 22, pp. 7316-39.
3. Chang, J., Fan, W. (2013) Endocrine therapy resistance: Current status, possible mechanisms and overcoming strategies. *Anticancer Agents Med Chem*, no 13, pp. 464-475.
4. Tapper, W., Hammond, V., Gerty, S., Ennis, S., Simmonds, P., Collins, A., Eccles, D. (2008) The influence of genetic variation in 30 selected genes on the clinical characteristics of early onset breast cancer. *Breast Cancer*, no. 10, pp. 108-118.
5. Osborne, C.K. (1998) Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat*, no 51, pp. 227-38.
6. Higgins, M.J., Stearns, V. (2009) Understanding resistance to tamoxifen in hormone receptor-positive breast cancer. *Clin Chem*, no 55, pp. 1453-1455.

ИММУНОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА КУКУРБИТ(n)УРИЛОВ (n=6,7,8)

А.А. Ермаков, А.А. Актанова, Е.А. Пашкина

Научный руководитель: академик РАН, проф., д.м.н. В.А. Козлов

Новосибирский государственный медицинский университет

Россия, г. Новосибирск, Красный проспект, 52, 630091

E-mail: aleermak@mail.ru

IMMUNOTROPIC PROPERTIES OF CUCURBIT(n)URILS (n=6,7,8)

A.A. Ermakov, A.A. Aktanova, E.A. Pashkina

Scientific supervisor: Academic RAS, Prof., MD, V.A. Kozlov

Novosibirsk State Medical University

Russia, Novosibirsk, Krasny Ave., 52, 630091

E-mail: aleermak@mail.ru

Abstract. *Considerable interest of the medical community is directed to the research of new means of drug delivery, including nanoscale molecular containers - cucurbit[n]urils. An obligatory stage in the development of new drugs is the study of their safety, in particular concerning the immune system. In this article, we studied the immunomodulating properties of cucurbiturils, especially the cytotoxic and cytostatic effects of cucurbiturils on mononuclear cells of peripheral blood.*

Введение. Одним из наиболее перспективных направлений в развитии современной фармакотерапии является таргетная доставка лекарств. Подобные способы транспортировки веществ тесно связаны с наномедициной и основаны на доставке веществ, «направляемых» с помощью наночастиц. Одним из ярких примеров подобных наночастиц являются кукурбит(n)урилы (СВ) - макроциклические молекулы, состоящие из мономеров гликолурила, связанных метиленовыми мостиками. Перспективность их применения была доказана на примере использования комплексов СВ(7) с противоопухолевым лекарством цисплатином. Принято считать, что в фармацевтических дозировках СВ не оказывают системного токсического действия, но возможность специфической органной токсичности нельзя полностью исключить.

Цель исследования. Изучалась цитотоксичность СВ в отношении клеток иммунной системы.

Материалы и методы. Для исследований использовали венозную кровь условно здоровых доноров. Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) выделяли стандартно. Культивирование МНК ПК проводили в плоскодонных планшетах в концентрации 1 млн/мл в полной культуральной среде RPMI-1640. Для стимуляции пролиферации клеток использовали очищенные антиCD3 антитела в концентрации 1 мкг/мл. Культивирование МНК ПК проводили в присутствии СВ(n) (n=6, 7, 8) в концентрациях 0,1 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ во влажной атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °С в течение 72 часов. В качестве контроля использовались интактные МНК ПК. Для оценки поликлональной пролиферации МНК ПК здоровых доноров в ответ на активацию антиCD3 антителами был использован метод количественного анализа клеточного деления *in vitro*, основанный на применении внутриклеточного красителя карбоксифлуоресцеина (CFSE), флуоресценция которого снижается

пропорционально числу клеточных делений. Интенсивность флуоресценции красителя CFSE определялась методом проточной цитометрии. Пролиферация МНК ПК оценивалась как доля неподелившихся ($CFSE^{high}$) и поделившихся ($CFSE^{low}$) клеток. Результат регистрировался на 10 000 событий в случае. Для оценки цитотоксичности исследуемых соединений был применен МТТ тест. Клетки высаживали в 96-луночный планшет в среду RPMI-1640, содержащей 10 % FCS, с добавлением нарастающих концентраций СВ(n) (n=6,7,8), дублируя каждую лунку. Через 72 часа в каждую лунку добавляли по 15 мкл раствора МТТ в физрастворе (5 мкг/мл). Через четыре часа планшет центрифугировали, супернатант удаляли, к содержимому лунки добавляли 100 мкл диметилсульфоксида. После инкубирования была проведена оценка оптической плотности с помощью планшетного фотоколориметра. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением пакета прикладных программ «STATISTICA 6.0».

Результаты. СВ(6), СВ(7) и СВ(8) не оказывают цитотоксического действия на МНК ПК во всех используемых дозах от 0,1 до 1 мМ. Однако в ходе исследования (табл. 1) была замечена тенденция по проявлению эффекта цитотоксичности СВ(7) в концентрации 1 мМ. Полученные данные совпадают с данными зарубежных исследователей, согласно которым СВ нетоксичны по отношению к клеточным линиям, тканям человека и животных в домолярных концентрациях [1,2].

При исследованиях *in vivo* так же отмечалась низкая токсичность СВ [3]. Известно, что при применении СВ(7) в очень высоких дозах возможны проявления эффектов нейро- и миотоксичности, но в концентрациях, необходимых для формирования комплексов с лекарственными препаратами, признаков токсичности нет [4,5].

Таблица 1

Определение цитотоксического действия СВ(n) (n=6, 7, 8) на МНК ПК с помощью МТТ-теста

Тип СВ(n)	Показатели оптической плотности при длине волны 540 нм			
	0 мМ	0,1 мМ	0,5 мМ	1 мМ
СВ(6)	0,509(0,398-0,696)	0,488(0,382-0,680)	0,495(0,341-0,643)	0,487(0,382-0,680)
СВ(7)		0,559(0,365-0,675)	0,474(0,411-0,746)	0,473(0,340-0,582)*
СВ(8)		0,460(0,368-0,627)	0,545(0,418-0,635)	0,506(0,394-0,582)

*-Тенденция (p=0,055) по сравнению с контролем.

Поскольку оценка цитотоксичности по методу МТТ не позволяет точно оценить возможное влияние препарата на пролиферацию клеток, были проведены эксперименты с CFSE-окрашенными МНК ПК. Была проанализирована способность СВ(n) (n=6, 7, 8) подавлять как спонтанную пролиферацию МНК ПК, так и индуцированную антиCD3 антителами.

Показано, что СВ(6) и СВ(8) не оказывают влияния на пролиферативную активность МНК ПК в случаях и спонтанной, и антиCD3-индуцированной пролиферации. СВ(7) в исследуемых дозах не оказывал влияния на спонтанную пролиферацию (табл. 2), однако, при применении антиCD3 антител пролиферативная активность на уровне контроля была зафиксирована только при использовании дозы СВ(7) в 0,1 мМ. С дозами СВ(7) в 0,5 и 1 мМ пролиферация подавлялась на 30 % и 75 % соответственно (табл. 3).

Таблица 2

Влияние СВ(n) на спонтанную пролиферативную активность МНК ПК

Тип СВ(n)	Относительное количество пролиферирующих клеток			
	0 мМ	0,1 мМ	0,5 мМ	1 мМ
СВ(6)	4,40(4,0-8,40)	4,40(4,0-7,90)	7,10(4,40-7,60)	4,20(3,70-9,20)
СВ(7)		4,60(3,80-6,50)	5,70(4,50-8,60)	6,70(4,30-9,40)
СВ(8)		4,0(3,60-7,60)	4,20(4,10-5,40)	4,40(3,90-8,20)

Таблица 3

Влияние СВ(n) на антиCD3-индуцированную пролиферативную активность МНК ПК

Тип СВ(n)	Относительное количество пролиферирующих клеток			
	0 мМ	0,1 мМ	0,5 мМ	1 мМ
СВ(6)	41,60(38,70-43,50)	39,50(36,0-40,90)	39,50(35,30-40,0)	39,50(34,20-41,90)
СВ(7)		39,20(39,10-39,30)	29,30(22,0-35,20)*	10,40(8,70-22,60)*
СВ(8)		43,70(33,70-48,20)	42,50(36,70-47,60)	41,80(38,90-42,90)

*-достоверные различия по сравнению с контролем.

Выводы. При оценке цитотоксичности СВ(n) (n=6, 7, 8) на МНК ПК было обнаружено, что СВ практически не оказывают цитотоксического действия на МНК ПК. СВ(7) в концентрации 0,5 и 1 ммоль способен подавлять пролиферативную активность, вызванную антиCD3 антителами. СВ(6) и СВ(8), а также СВ(7) в концентрации 0,1 ммоль не оказывают влияния, как на спонтанную, так и на индуцированную антиCD3 антителами пролиферацию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jeon Y.J., Kim S.Y., Ko Y.H., Sakamoto S., Yamaguchi K., Kim K. (2005). Novel molecular drug carrier: encapsulation of oxaliplatin in cucurbit[7]uril and its effects on stability and reactivity of the drug. *Org. Biomol. Chem.*, v.3, no. 11, pp. 2122-2125.
2. Hettiarachchi G., Nguyen D., Wu J., Lucas D., Ma D., Isaacs L., Briken V. (2010). Toxicology and Drug Delivery by Cucurbit[n]uril Type Molecular Containers. *PLoS. One*, 5(5): e10514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010514> pp. 10514.
3. Uzunova V.D., Cullinane C., Brix K., Nau W.M., Day A.I. (2010). Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: an exploratory in vitro and in vivo study. *Org. Biomol. Chem.*, v. 8, no. 9, pp. 2037–2042.
4. Chen H., Chan J.Y.W., Yang X., Ian W. (2015). Developmental and organ-specific toxicity of cucurbit[7]uril: in vivo study on zebrafish models. *Journal of RSC Adv.*, v. 5, pp. 30067-30074.
5. Oun R., Floriano R.S., Isaacs L., Rowana E.G., Wheate N.J. (2014). The ex vivo neurotoxic, myotoxic and cardiotoxic activity of cucurbituril-based macrocyclic drug delivery vehicles. *Toxicol Res (Camb.)*, v. 3, no. 6, pp. 447-455.

**ВЛИЯНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ**

И.Б. Жамангаринова, Н.А. Лушникова, М.Р. Патышева

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Ю.Г. Кжышковска

Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г.Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: inzhu_03.01@mail.ru

**THE INFLUENCE OF THE FEATURES OF TUMOR ON THE PHENOTYPIC PROPERTIES OF
PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH BREAST CANCER**

I.B. Zhamangarinova, N.A. Lushnikova, M.R. Patysheva,

Scientific supervisor: Prof., Dr. Yu.Kzhyshkowska

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: inzhu_03.01@mail.ru

Abstract. *Monocytes as effectors of the innate immunity present an attractive target for diagnostic and therapy of diseases with inflammatory processes. Inflammation plays an important role in the process of origin and development of breast cancer [1]. In this study, subpopulations of monocytes associated with inflammation and expressing CD68, CD163, CD206, CD119 (INF-R), CD124 (IL-4R), stabilin-1 and the number of monocytes producing cytokines IL-1 β and TNF- α were quantitatively determined in peripheral blood in patients with breast cancer and healthy people by flow cytometry. The expression levels of genes associated with the inflammatory status of monocytes IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β , stabilin-1, CCL18, were obtained in CD14⁺ mononuclear cell fraction with qPCR. Concentration of INF γ , IL-1 β , TNF- α was determined in serum of breast cancer patients and healthy donors by ELISA. Significant differences of variables received from patient and healthy donors were detected. The molecular subtype, the size of the primary tumor and the involvement of regional lymph nodes affect to phenotypic properties of monocytes in patients with breast cancer.*

Введение. Моноциты составляют около 8% лейкоцитарных клеток периферической крови (ПК). В случае онкологических заболеваний они интересны как предшественники дендритных клеток, миелоидных клеток-супрессоров, а также опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ). С другой стороны, моноциты являются непосредственными участниками воспаления, значимость которого признана при манифестации и течении рака молочной железы (РМЖ) [1]. Для ряда заболеваний, сопровождающихся воспалением (сепсис, вирусный гепатит В, ВИЧ инфекция, ревматоидный артрит, сахарный диабет 2 типа), выявлено наличие моноцитов, несущих поверхностные маркеры макрофагов, обладающих противовоспалительными свойствами (M2 макрофагов) – CD163, CD206 [2-5]. Такую поляризацию предполагают использовать в качестве прогностического признака заболевания [2,5]. Помимо уже известных маркеров стабилин-1, представленный на макрофагах, активированных по альтернативному типу, также представляет интерес для изучения его экспрессии на моноцитах периферической крови [6]. Доказанная возможность дифференцироваться в ОАМ предполагает значимое

место моноцитов среди прочих клеток иммунной системы в патогенезе РМЖ, что, в свою очередь, позволяет предположить прогностическую ценность показателей, характеризующих состояние данного клеточного пула [7]. Целью данной работы была оценка взаимосвязи особенностей опухолевого процесса с субпопуляционным составом моноцитов ПК, а также экспрессией генов воспалительного профиля этих клеток у больных РМЖ.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 25 пациенток с впервые диагностированным инвазивным РМЖ в стадии T1-2N-2M0 с люминальными А и В, трижды негативным подтипами, прошедшие неоадьювантную химиотерапию (НАХТ) и оперативное лечение. В качестве контрольной группы выступали 6 здоровых женщин. В ПК методом проточной цитофлуориметрии были определены субпопуляции моноцитов, экспрессирующие CD45, CD68, CD163, CD206, CD119 (INF- γ R), CD124 (IL-4R), стабиллин-1, а также количество моноцитов, продуцирующих цитокины ИЛ-1 β и ФНО- α . Для анализа уровня экспрессии генов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , ТФР- β , CCL18, стабиллин-1 ассоциированных с воспалительным статусом моноцитов, из ПК методом магнитной сепарации была получена фракция CD14+ клеток, выделена тотальная РНК с последующей конверсией в кДНК и проведена количественная ПЦР в режиме реального времени. В сыворотке ПК был количественно определен уровень воспалительных (ИФН- γ , ИЛ-1 β и ФНО- α) и противовоспалительных (ИЛ-4) цитокинов методом ИФА.

Результаты. Известно, что характерной особенностью злокачественного процесса является системное воспаление [1]. Действительно, в нашем исследовании уровень воспалительных цитокинов ИФН- γ , ИЛ-1 β и ФНО- α у больных РМЖ превышал соответствующие показатели у здоровых лиц в 4,48; 4,48 и 1,83 раза ($p=0,07$; $p=0,002$ и $p=0,1$). Увеличение уровня воспалительных цитокинов в ПК сопровождалось статистически значимым снижением экспрессии генов ИЛ-1 $\beta=0,024$, ИЛ-6=0,07, ФНО- $\alpha=0,26$ и уменьшением количества моноцитов с внутриклеточной продукцией ИЛ-1 β по сравнению со здоровым контролем ($p<0,05$). У пациенток с РМЖ в ПК наблюдалось более высокое содержание CD68+ моноцитов в сравнении с соответствующим показателем в группе здоровых лиц ($1,88\pm 0,45\%$ и $0,38\pm 0,11\%$, $p=0,0078$). Другим значимым отличием в популяционной структуре моноцитов ПК у больных РМЖ явилось снижение M2 (CD163+) популяции и пула CD124+ моноцитов, экспрессирующих рецепторов к ИЛ-4 – главному индуктору M2-поляризации, по сравнению со здоровыми лицами. Если в группе контроля CD163+ моноциты составляли 14,35% от всех моноцитов, то у больных злокачественным новообразованием данный показатель равнялся лишь 0,85% ($p=0,0009$). CD124+ популяция моноцитов у больных РМЖ в 3,6 раза меньше, чем у здоровых лиц ($p=0,005$). При этом экспрессия генов-маркеров M2 в моноцитах и уровень сывороточного ИЛ-4 не имели различий в группах сравнения.

Проведенное исследование также выявило, что молекулярно-генетический подтип опухоли оказывает влияние на свойства моноцитов ПК. Так, наличие трижды негативного рака молочной железы сопровождалось увеличением в 10 раз количества моноцитов, продуцирующих ИЛ-1 β , по сравнению с соответствующими показателями у пациенток с люминальными подтипами РМЖ ($p=0,02$). При этом трижды негативный РМЖ приводил к гипоэкспрессии гена ИЛ-6. Размер первичного узла исходно (до лечения) не оказывает влияния на молекулярный профиль моноцитов у больных РМЖ. Но на фоне проведения лечения моноциты изменяют свой профиль в зависимости от размера первичного узла. Так, у

больных с T2 после проведения 2 курсов НАХТ в моноцитах была выявлена меньшая экспрессия гена ИЛ-1 β , а после хирургического удаления первичного узла меньшая экспрессия гена ФНО- α по сравнению таковой у больных с T1. Вовлечение регионарных лимфатических узлов (N1) сопровождалось достоверным увеличением следующих субпопуляций моноцитов: CD119+ в 1,34 раза, CD124+ в 29 раз и CD163+ в 119 раз, снижением стабиллин-1 моноцитов в 3 раза, а также уменьшением экспрессии генов IL1 в 5 раз, TNFa в 7 раз, SI-CLP в 1,75 раза ($p < 0,05$).

Заключение. Наличие опухолевого процесса и его особенности (молекулярно-генетический подтип, размер первичного узла и степень метастатического поражения лимфатических узлов) оказывают статистически значимое влияние на субпопуляционный состав и экспрессию генов воспалительного профиля моноцитов ПК. Выявленные данные свидетельствуют о возможной прогностической ценности молекулярного профиля моноцитов при РМЖ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-29-06037 «Геномные механизмы регуляции опухолевой прогрессии рака молочной железы в условиях лекарственной терапии».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ben-Baruch, A. (2012) The Tumor-Promoting Flow of Cells Into, Within and Out of the Tumor Site: Regulation by the Inflammatory Axis of TNFa and Chemokines. *Cancer Microenvironment*, no.5 (2), pp. 151-164.
2. Huang D., Sansass B., Jiang J., Gong Q., Wan M., Chen L., Yang W., Jin G., Yu D., Zhu M., Wei D., Zhang D., Inchauspé G., Zhang X., Zhu R. (2017) Soluble CD163 and their expression on monocytes, constituent potential molecular signature associated with liver inflammation and HBV-specific immune responses. *Journal of hepatology*, no.66 (2), pp. 1107-1336.
3. Kjargaard A.G., Rodgaard-Hansen S., Dige A., Krog J., Moller H.J., Tonnesen E. (2014) Monocyte Expression and Soluble Levels of the Haemoglobin Receptor (CD163/sCD163) and the Mannose Receptor (MR/sMR) in Septic and Critically Ill Non-Septic ICU Patients, *PLoS one*, no.9 (3), pp. 1932-6203.
4. Smiljanovic B., Radzikowska A., Kuca-Warnawin E., Kurowska W., Grün J. R., Stuhlmüller B., Bonin M., Sörensen T., Bruns A., Hermann S., Ohrndorf S., Aupperle K., Backhaus M., Burmester G.R., Radbruch A., Grützkau A., Maslinski W., Häupl T. (2017) Increased turnover of monocytes in patients with rheumatoid arthritis identified by transcriptome and cytometric profiling. *Annals of the Rheumatic Diseases*, no 76 (1), pp. 55.
5. Tuluc F., J. Meshki, Spitsin S.V., Douglas S.D. (2014) HIV infection of macrophages is enhanced in the presence of increased expression of CD163 induced by substance P. *Journal of leukocyte biology*, no. 96 (1) pp. 143-150.
6. Kzhyshkowska J., Gudima A., Moganti K., Gratchev A., and Orekhov A. (2016) Perspectives for Monocyte/Macrophage-Based Diagnostics of Chronic Inflammation. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, no. 43 (2) pp 66-77.
7. Condeelis J., Pollard J.W. (2006) Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*, no.124 (2), pp. 263-6.

**БЛОКАДА D2 ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ КАК НОВЫЙ ПОДХОД КОРРЕКЦИИ
НАРУШЕНИЙ В АЛЬВЕОЛЯРНОЙ ПАРЕНХИМЕ И РЕГУЛЯЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ
ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭМФИЗЕМЕ ЛЕГКИХ**

М.А. Жукова², Э.С. Пан¹, В.А. Крупин¹

Научный руководитель: профессор, д.м.н. Е.Г. Скурихин

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук». Научно исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга. Лаборатория регенеративной фармакологии.

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634028

Научный руководитель: профессор, д.м.н. О.Е. Ваизова

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050

E-mail: mashazyk@gmail.com

**BLOCKADE D2 DOPAMINE RECEPTORS AS A NEW APPROACH TO CORRECTION OF
VIOLATIONS IN ALVEOLAR PARENCHYMA AND REGULATION OF ENDOTHELIAL
PROGENITOR CELLS IN PULMONARY EMPHYSEMA**

M.A. Zhukova^{**}, E.S. Pan^{*}, V.A. Krupin^{*}

Scientific Supervisor: Prof., PhD E.G. Skurikhin

¹Tomsk national research medical center the Russian academy of sciences.

Institute of Pharmacology Russia, Tomsk, Lenina Ave., 3, 634028

Scientific Supervisor: Prof., PhD O.E. Vaizova

²Siberian State Medical University Russia, Tomsk, Moskvitskiy trakt, 2, 634050

E-mail: mashazyk@gmail.com

Abstract. *On the model of emphysema of the lungs caused by an extract of cigarette smoke or elastase, it was shown that siperone has an anti-inflammatory effect, reduces the area of emphysema, stimulates the regeneration of alveolar cells and the microvascular channel. The effects of siperone are associated with changes in the activity of the progenitor cells, in particular cells expressing Notch1.*

Введение. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) представляет собой прогрессирующее заболевание легких с хроническим воспалением альвеолярной ткани. Терапия ХОБЛ основывается на использовании лекарственных средств (бронхолитики, вакцины, глюкокортикоиды, антибиотики, муколитики, иммунорегуляторы) и немедикаментозных подходах (оксигенотерапия, трансплантация легких и др.). Однако известные лекарственные средства не способны стимулировать регенерацию альвеолярной паренхимы, полного выздоровления больного достичь не возможно [1]. Органная трансплантация ограничена из-за отсутствия необходимого донорского материала [2].

Применение клеточной терапии затруднено в связи с недостаточностью сведений о судьбе введенных в организм клеток и механизме регуляции их функций [3]. Перспективным направлением терапии ХОБЛ может являться регуляция активности костномозговых и тканеспецифических стволовых и прогениторных клеток больного. Как известно, стволовые и прогениторные клетки взрослого человека обладают достаточно высоким потенциалом для регенерации специализированных клеток и тканей при патологии. Между тем, во врачебной практике нет средств регуляции свойств костномозговых и тканеспецифичных стволовых клеток (СК) при ХОБЛ (мобилизации, миграции, пролиферации, дифференцировки и др.), применение которых могло бы привести к восстановлению структуры и функции микрососудистого русла, альвеолярного эпителия, соединительно-тканной компоненты легкого. В качестве возможного средства, способного оказать влияние на эндотелиальные стволовые клетки-предшественницы, нами предложен спиперон - антагонист D_2 рецепторов. Выбор в пользу спиперона обусловлен его положительным влиянием на альвеолярную паренхиму при фиброзе легкого [4].

Цель исследования. Изучить влияние спиперона на воспаление, микроциркуляторные нарушения, альвеолярный эпителий и прогениторные клетки при эмфиземе легкого.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на мышах самках линии C57Bl/6 в возрасте 8 недель. Эмфизему легких вызывали свиной панкреатической эластазой или экстрактом табачного дыма [5]. Исследовали эффекты спиперона (Sigma, США) в дозе 0,15 мг/кг. В морфологических исследованиях оценивали гистоархитектонику ткани легких: наличие отека, воспалительную инфильтрацию, венозный застой, утолщения стенок сосудов и бронхов, относительную площадь эмфизематозно-расширенных альвеол. Иммуногистохимическое исследование легких проводили стрептавидин-биотин-пероксидазным методом с использованием кроличьих поликлональных специфических мышинных антител «Abcam» к CD16, CD31 и пан-цитокератину (AE1/AE3). В цитофлуориметрических исследованиях использовали прибор FACS Canto II с программным обеспечением FACS Diva («BD Biosciences», США). По результатам исследования экспрессии антигенов CD31, CD34, CD45, CD49f, CD73, CD90, CD117, CD309, CD326, TER119 на мононуклеарах легких делали вывод о количестве мультипотентных предшественников эпителиальных клеток ($CD326^{hi}CD49f^+CD45^-$) и эпителиальных прогениторных клеток ($CD45^-TER119^-CD49f^+$), предшественников ангиогенеза ($CD45^-CD309^+CD117^+$) и прогениторных эндотелиальных клеток ($CD45^-CD31^+CD34^+$), экспрессирующих рецептор к VEGF (Vascular endothelial growth factor), в легких и крови. При изучении экспрессии внутриклеточного рецептора Notch1-сигналинга на клетках использовали антитела Notch1 (PE) («BD Biosciences», США).

Результаты и их обсуждение. Показано, что спиперон уменьшает воспаление и инфильтрацию интерстиция альвеол и альвеолярных ходов $CD16^+$ клетками (лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы), препятствует разрушению межальвеолярных перегородок и эмфизематозному расширению альвеол, при этом повышается экспрессия CD31 на клетках просветов кровеносных сосудов и цитокератина, локализуемого диффузно в альвеолярной ткани. Одновременно с регенерацией эпителия и эндотелия отмечается повышение количества различных предшественников эндотелиальных клеток, прогениторных эпителиальных клеток, мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в легких и крови. Изменение числа $Notch1^+$ клеток в ряде фракций предшественников ангиогенеза и прогениторных эндотелиальных клеток, экспрессирующих VEGF, и ММСК указывает на вовлечение Notch 1 сигналинга в регенерацию микрососудистой сети легких.

Вывод. Полученные результаты могут стать основой для разработки нового подхода к ускорению регенерации альвеолярной ткани при ХОБЛ, направленного на коррекцию свойств прогениторных клеток и активности Notch1 сигналинга препаратами, угнетающими активность дофаминовой системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клинические рекомендации. Пульмонология / Под ред. А.Г. Чучалина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 240 с.
2. Щербук Ю.А., Багненко С.Ф., Гриненко О.А., Полушин Ю.С., Логинов И.В., Бутина Л.В., Резник О.Н., Соколов А.В., Кечаева Н.В., Теплов В.М., Семенов М.Е. Дефицит донорских органов: причины, проблемы, пути решения // Вестник анестезиологии и реаниматологии. - 2011. – Т. 8. - №2. - С. 31-42.
3. Tzouvelekis A, Laurent G, Bouros D. (2013). Stem cell therapy in chronic obstructive pulmonary diseases. Seeking the Prometheus effect. *Current Drug Targets*, no. 14(2), pp. 246-252.
4. Skurikhin E.G., Khmelevskaya E.S., Ermakova N.N., Pershina O.V., Reztsova A.M., Krupin V.A., Stepanova I.E., Reztsova V.M., Reikhart D.V., Dygai A.M. (2014). Effect of spiperone on mesenchymal multipotent stromal and hemopoietic stem cells under conditions of pulmonary fibrosis. *Bulletin of experimental biology and medicine*, no. 157(1), pp. 132-137.
5. Chen Y., Hanaoka M., Chen P., Droma Y., Voelkel N.F., Kubo K. (2009). Protective effect of beraprost sodium, a stable prostacyclin analog, in the development of cigarette smoke extract-induced emphysema. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, no. 296(4), pp. 648-656.

**ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В СОСТАВЕ ТАРГЕТНЫХ
НАНОМАТЕРИАЛОВ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ**

А.А. Захарова¹, О.Я. Брикунова¹, Т.Р. Низамов³

Научный руководитель: старший научный сотрудник, к.б.н. А.Г. Першина^{1,2}

¹Национальный исследовательский Томский политехнический
университет, Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050

²Сибирский государственный медицинский университет, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050

³Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Россия, г. Москва,
Ленинский проспект, 4, 119991
E-mail: alexandraz.6946@gmail.com

**SIZE EFFECT OF MAGNETIC NANOPARTICLE IN TARGETED NANOMATERIALS ON
CYTOTOXICITY**

A.A. Zakharova¹, O.Ya. Brikunova¹, T.R. Nizamov³

Scientific Supervisor: PhD A.G.Pershina^{1,2}

Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenina str., 30, 634050

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskowsky trakt, 2, 634050

National University of Science and Technology "MISIS", Russia, Moscow, Leninsky prospect, 4, 119991
E-mail: alexandraz.6946@gmail.com

Abstract. *The size and shape of the nanoparticles have a great influence on cytotoxicity, capture efficiency by cells and biodistribution. We investigated cytotoxicity of targeted nanomaterial based on various-sized magnetic iron oxide nanoparticles. In in vitro experiments it was shown that nanoparticles size play a crucial role in cytotoxicity and cell uptake.*

Введение. Перспективным и активно развивающимся направлением в области создания систем целевой доставки для диагностики и терапии рака является использование магнитных наночастиц. Магнитные наночастицы позволяют получить тераностическую систему так как обладают терапевтическим и диагностическим потенциалом. Для успешного использования систем на основе наночастиц необходимым условием является их низкая токсичность. Основными характеристиками, влияющими на цитотоксичность и эффективность проникновения наночастиц в клетки, являются размер частиц, форма и свойства покрытия. Размер и форма наночастиц оказывают влияние на биораспределение [1]. Так показано, что наночастицы диаметром менее 20 нм проникают в опухоль глубже, но имеют более короткий период биodeградации, в то время как наночастицы размером 30-200 нм эффективно накапливаются в опухоли за счет эффекта повышенной проницаемости и удерживания в опухоли. Наночастицы с размером менее 6 нм выводятся почками, тогда как с размером более 200 нм накапливаются преимущественно в селезенке [2]. Есть данные, что нанотрубки дольше циркулируют в кровотоке и лучше захватываются клетками, чем наночастицы сферической и кубической формы [3]. Однако это наблюдение справедливо только в том случае, когда размер наночастиц превышает 100 нм. Огромное влияние на взаимодействие наноматериала с клетками и поведение *in vivo* имеет химический

состав исходных наночастиц, в связи с чем, существующие данные полученные при исследовании углеродных нанотрубок или наночастиц золота не позволяют прогнозировать поведение в организме, например, наночастиц оксида железа.

Цель работы. изучить влияние размера магнитных наночастиц (МНЧ) оксида железа, конъюгированных с пептидом рНLIP, на цитотоксичность наноматериала *in vitro*.

Материалы и методы. Для эксперимента использованы клеточные линии аденокарциномы молочной железы мыши 4Т1 и недифференцированных фибробластов мыши 3Т3. Магнитные наночастицы оксида железа (MNP) синтезированы методом термического разложения из ацетилацетоната железа. Модификация поверхности выполнена с использованием 3-аминопропилтриметоксисилана. Исследуемые наноматериалы получены за счет ковалентной прививки рН-зависимого встраивающегося пептида (рНLIP) на модифицированную поверхность MNP с размером магнитного ядра до 10 (MNP-рНLIP-1) и до 20 (MNP-рНLIP-2) нм. Цитотоксическое действие наноматериала на клетки исследовано методом MTS-теста. Эффективность связывания наноматериала с клетками рассчитана на основании измерения концентрации железа в клетках, после инкубации с наноматериалом в течение 1 часа, феррозиновым методом.

Результаты. Экспериментальное исследование влияния размера наночастиц в состав наноматериала на цитотоксичность выполнен на моделях опухолевых и не опухолевых клеток. Согласно данным эксперимента через 24 часа инкубации наноматериал MNP-рНLIP-1 не проявлял цитотоксического действия в отношении обеих линий клеток. Через 48 часов инкубации при концентрации наноматериала в среде более 50 мг/л наблюдали снижение активности дегидрогеназ в клетках линии 4Т1 не более чем на 15%, тогда как в отношении неопухолевых клеток 3Т3 наноматериал цитотоксичности не проявлял (Рис.1А, В). Наноматериал MNP-рНLIP-2 оказывал более выраженное цитотоксическое действие, так через 24 часа наблюдали снижение жизнеспособности клеток линии 4Т1 во всем исследуемом диапазоне концентраций наноматериала в среде (10-100 мг/л) (Рис.1С). На линии не опухолевых клеток 3Т3 цитотоксическое действие зафиксировано через 48 часов при концентрации MNP-рНLIP-2 в среде 75 мг/л и более (Рис.1 D).

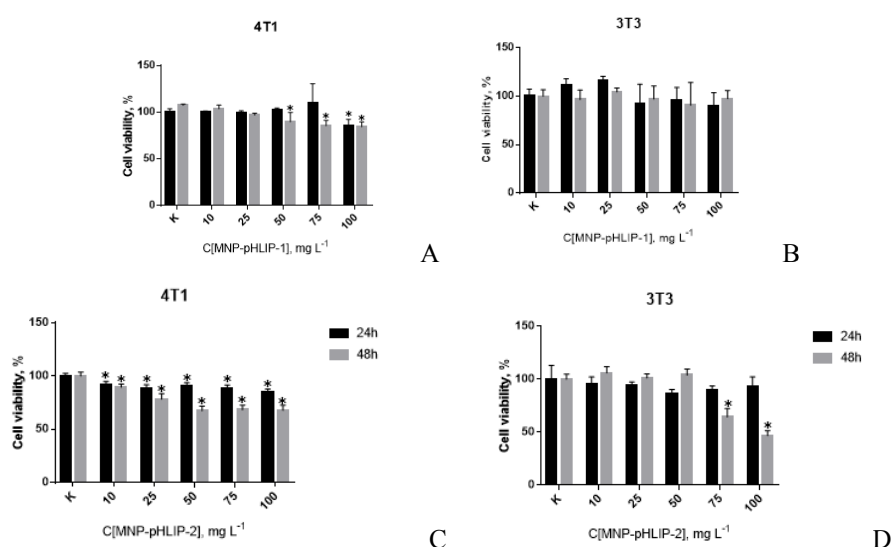


Рис.1. (A-D) Влияние MNP-pHLIP-1 и MNP-pHLIP-2 на жизнеспособность клеток

Увеличение цитотоксичности может быть вызвано более высоким содержанием наночастиц в клетке. В связи с этим, в следующей серии экспериментов была оценена эффективность проникновения исследуемых наноматериалов в клетки. Результаты эксперимента показали, что MNP-pHLIP-1 проникает в клетки более эффективно, чем MNP-pHLIP-2 (рис. 2). Важно отметить, что через 1 час инкубации клетки неопухолевой линии 3Т3 содержали больше наноматериала, чем клетки 4Т1, что указывает на зависимость эффективности проникновения наноматериала от типа клеток. Это может быть связано с тем, что более крупные наночастицы, взаимодействуя с клетками, вызывают более сильные повреждения клеток, приводящие к их гибели, в связи с чем количество клеток, содержащих MNP-pHLIP-2, меньше, чем при инкубации с MNP-pHLIP-1.

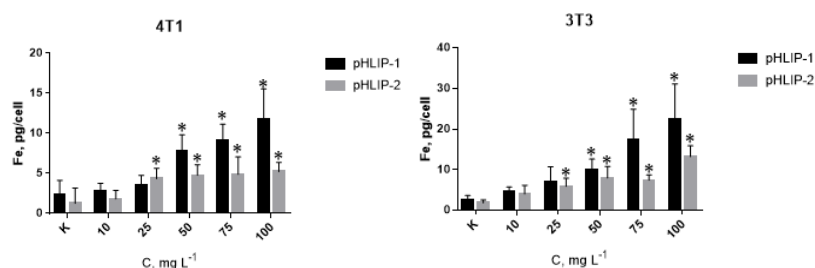


Рис.2. Концентрация железа в клетках после инкубации с MNP-pHLIP-1 и MNP-pHLIP-2 в течение 1 часа

Заключение. Таким образом, увеличение размера магнитных наночастиц, входящих в состав наноматериала, приводит к усилению его цитотоксичности в отношении клеток, причем опухолевые клетки более чувствительны к негативному воздействию наноматериалов по сравнению с неопухолевыми клетками.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 17-14- 01316 «Адресные наногибридные материалы для терапии и диагностики онкологических патологий», 2016-2018.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buzea C., Pacheco I. I., Robbie K. (2007) Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, no. 4, pp. MR17-MR71.
2. Reddy L. H. et al. (2012) Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical reviews*, no. 11, pp. 5818-5878.
3. Gratton S. E. A. et al. (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, no. 33, pp. 11613-11618.

**СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ У ВПЧ16-ПОЗИТИВНЫХ
БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ**

М.К. Ибрагимова^{1,2}, А.М. Певзнер¹

Научный руководитель: д.б.н. Н.В. Литвяков^{1,2}

¹Томский национальный исследовательский медицинский центр

Российской академии наук, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634050

²НИ Томский государственный университет, Россия, г. Томск, пр. Ленина 36, 634050

E-mail: imk1805@yandex.ru

**METHOD OF PROGNOSIS OF THE DISEASE OUTCOME IN HPV16-POSITIVE PATIENTS WITH
CERVICAL CANCER**

M.K. Ibragimova^{1,2}, A.M. Pevzner¹

Scientific Supervisor: N.V. Litviakov^{1,2}, Ph.D.

¹Tomsk National Research Medical Center

of Russian Academy of Sciences, Kooperativny str. 5, Tomsk, 634050, Russia,

²Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: imk1805@yandex.ru

Abstract. *The study involved 87 patients with the stage I-IV cervical cancer patients. The comprehensive survey included colposcopy, cytological and histological analysis, detection and genotyping of high-risk human papillomavirus, viral load and physical status of HPV16 DNA was evaluated. As a result of the study the predictive value of the physical status of type 16 HPV was determined for relapse-free and overall survival of patients with cervical cancer.*

Введение. По данным различных исследований до 85-95% больных раком шейки матки (РШМ) в России являются носителями вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР), и, соответственно, только 5-15% опухолей шейки матки не содержит вируса. При этом, из всех ВПЧ-позитивных больных раком шейки матки, до 70% являются носителями именно ВПЧ 16 генотипа [1].

В настоящее время известно, что в 90% случаев ВПЧ-инфекция у здоровых женщин в течение нескольких месяцев может быть спонтанно элиминирована из организма [2]. Возможность элиминации вируса из клетки-хозяина определяется совокупностью многих факторов, в том числе и физическим статусом ДНК ВПЧ. При эписомальной форме ВПЧ у большей части пациенток происходит элиминация ВПЧ и не развивается дисплазия и РШМ [1]. Интегрированная форма вируса дольше сохраняется, благодаря чему обнаруживается в эпителиальных дисплазиях высокой степени и РШМ, вызывает пролиферативные процессы в клетках, геномную нестабильность и формирование мутаций [3, 4].

Целью настоящей работы явилась разработка способа прогнозирования исхода заболевания у ВПЧ16-позитивных больных раком шейки матки.

Материал и методы. В исследование было включено 87 пациенток в возрасте от 21 до 79 лет с первичным РШМ I-IVA стадий, проходивших обследование и лечение в Томском НИИ онкологии. Диагноз верифицирован гистологически, опухоли были охарактеризованы в соответствии с

классификацией FIGO (классификация Международной федерации акушеров и гинекологов). Комплексное обследование включало гинекологический осмотр, кольпоскопию, цитологическое и гистологическое исследование, что позволило верифицировать диагноз. Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки. Выявление, генотипирование ДНК ВПЧ и определение физического статуса ДНК ВПЧ 16 типа проводили методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе RotorGene 6000 («Corbett Research», Австралия) с использованием комплектов реагентов фирмы «Amplisens®» (Москва, Россия).

Выявление области E6 при отсутствии области E1/E2 интерпретировалось как интеграция ВПЧ в ДНК человека, выявление области E6 при наличии области E1/E2 – как смешанная форма/частичная интеграция вируса в ДНК человека, отсутствие области E6 при наличии области E1/E2 – как эписомальная форма вируса.

Для оценки статистической значимости различий в распределении частот качественных признаков между группами использовали двусторонний критерий Фишера <http://vassarstats.net/odds2x2.html>. Для количественных признаков использовали U-критерий Манна-Уитни. Оценку выживаемости проводили по методу Каплана-Майера.

Примечание: каждая пациентка из представленной группы являлась носительницей ВПЧ 16 типа (монотип или в комбинации с другими типами).

Результаты и обсуждение. В ходе нашего исследования было показано, что частоты форм ВПЧ 16 типа распределились следующим образом: эписомальная форма встречалась в 8.9% случаев, смешанная и интегрированная – в 64.6% и 26.5% случаев, соответственно, полученные данные не противоречат литературным.

Далее были проанализированы исходы заболевания в зависимости от физического статуса вируса. На рисунке 1 представлена безрецидивная (а) и общая (б) выживаемость больных РШМ в зависимости от физического статуса вируса для HPV16+ больных, а также для сравнения представлена группа ВПЧ-пациенток.

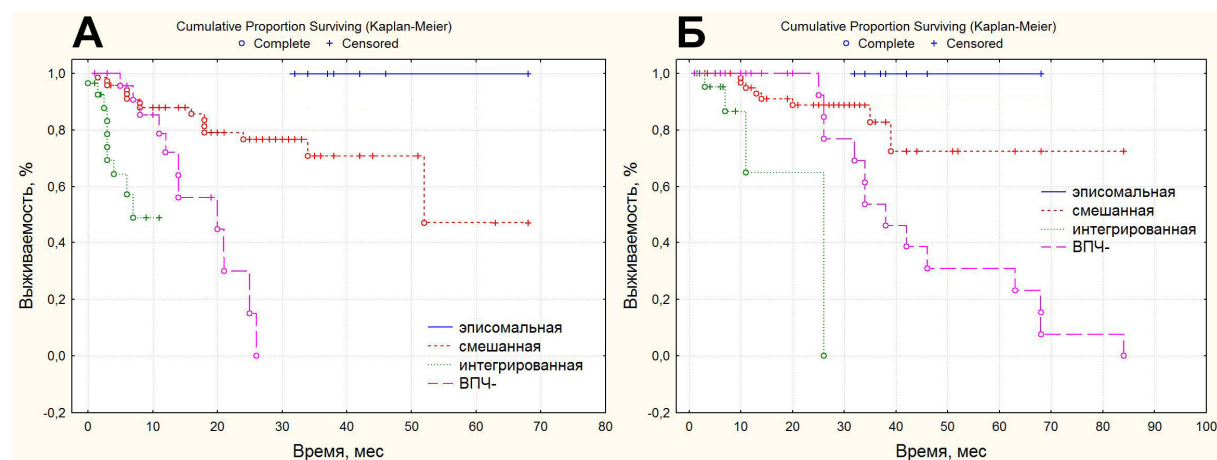


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных РШМ ($p = 0,0001$) (а) и общая выживаемость больных РШМ ($p = 0,0004$) (б)

Установлено, что распределение безрецидивной и общей выживаемости для всех групп больных статистически значимо ($p=0,03$). У больных с эписомальной формой ВПЧ16 типа наблюдается 100% безрецидивная и общая выживаемость. Медиана безрецидивной выживаемости больных со смешанной формой ВПЧ16 составила 52 месяца, медиана общей выживаемости не достигнута. Самый неблагоприятный исход отмечается у больных с интегрированной формой ВПЧ16 типа. Медиана безрецидивной выживаемости у них составила 7 месяцев и медиана общей выживаемости 25 месяцев. Было проведено сравнение основных клинико-патологических параметров у больных всех представленных групп, не установлено статистически значимых различий в распределении параметров (данные не представлены). Это показывает, что физический статус ВПЧ является независимым фактором прогноза РШМ. Таким образом, в результате исследования установлена прогностическая значимость физического статуса ВПЧ16 типа в отношении безрецидивной и общей выживаемости больных РШМ. Наличие эписомальной формы вируса является благоприятным прогностическим фактором. Интегрированная форма вируса является крайне неблагоприятным фактором прогноза и выживаемость таких больных значительно ниже, чем пациенток со смешанной формой вируса.

Заключение. В результате проведенного исследования, были получены данные о выживаемости больных РШМ в зависимости от физического статуса вируса для ВПЧ16+ больных. Было показано, что наилучший прогноз имеют ВПЧ16+ пациентки с эписомальной формой вируса, наихудший – ВПЧ16+ пациентки с интегрированной формой. Таким образом, проведение подобного анализа позволит в дальнейшем формировать группы повышенного риска для больных РШМ и обеспечивать персонализированный подход к лечению данной группы пациенток.

Работа выполнена в рамках программы «УМНИК» фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (договор № 11852ГУ/2017).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stanley M. (2010) Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic oncology*, no 117, pp. 5-10.
2. Назарова Н., Прилепская В., Суламанидзе Л., Мзарелуа Г., Бестаева Н. Папилломавирусная инфекция: распространенность, диагностика и лечение (обзор литературы) // *Лечащий врач*. – 2013 – № 11 – С. 15-19.
3. Hu Z., Zhu D., Wang W., Li W., Jia W., Zeng X., Ding W., Yu L., Wang X., Wang L. (2015) Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nature Genetics*, no 47, pp. 158–163.
4. Vink M.A., Bogaards J.A., van Kemenade F.J., de Melker H.E., Meijer C.J., Berkhof J. (2013) Clinical progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: estimating the time to preclinical cervical cancer from doubly censored national registry data. *American Journal of Epidemiology*, Vol. 178, no 7, pp. 1161–1169.

ВЛИЯНИЕ ФИЛЬТРАЦИИ НА КЛАССИФИКАЦИЮ СПЕКТРАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Э.Э. Ильясова^{1,2}, А.И. Князькова^{1,2}, Е.А. Сандыкова²

Научный руководитель: старший преподаватель, В.С. Заседатель

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

²Сибирский государственный медицинский университет

Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050

E-mail: elenor.93@mail.ru

INFLUENCE OF FILTRATION ON CLASSIFICATION OF SPECTRAL DATA

E.E. Ilyasova^{1,2}, A.I. Knyazkova^{1,2}, E.A. Sandykova²

Scientific Supervisor: senior lecturer, V.S. Zasedatel

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin Ave., 36, 634050

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, 2 Moskovsky trakt, 634050

E-mail: elenor.93@mail.ru

Abstract. *In the present study, we considered the influence of filtration on classification of model absorption spectra of exhaled air of healthy volunteers and patients with obstructive chronic lung disease with additive noise. The classification was carried out by the Support Vector Machine (SVM). According to the analysis the median filter negatively affects on data classification, the Savitzky–Golay filter increases specificity, however reduces sensitivity, the Second Order Butterworth Filter increases specificity and sensitivity.*

Введение. Одним из наиболее важных процессов в организме является газообмен с окружающей средой, основой которого является поглощение кислорода и выделение углекислого газа. Кроме этого в выдыхаемом человеком воздухе содержится до 600 летучих соединений, в том числе молекулы-биомаркеры эндогенного (продуцируемого в организме) происхождения, механизмы образования или выделения которых обладают специфичностью, достаточной для исследования как нормальных, так и патологических процессов.

Типичными маркерами для бронхо-легочных заболеваний являются молекулы этан и пентан преимущественно генерируются культурами клеток под действием активных форм кислорода. При анализе конденсата выдыхаемого воздуха больных ХОБЛ обнаружено следующие маркеры: H₂O₂, эйкозаноиды (лейкотриены, простаноиды, изопростаны), производные NO (S-нитросотиолы, нитриты и нитраты), альдегиды [1].

Появление в выдыхаемом воздухе указанных метаболитов является потенциальной основой для создания методов неинвазивной диагностики бронхо-легочных заболеваний на основе спектрального анализа выдыхаемого воздуха [2].

В рамках данной задачи представляет интерес анализ влияния процесса предварительной обработки экспериментальных спектров на примере лазерного оптико-акустического ИК газоанализатора на точность диагностики.

Процесс измерения спектров поглощения связан с воздействием на работу оптико-акустического газоанализатора линейных и нелинейных искажений, которые, в общем случае, являются случайными и моделируются в результирующем сигнале шумовой составляющей. В зависимости от применяемых методов обработки сигналов шум может моделироваться в виде аддитивного или мультипликативного вклада в сигнал.

В общем случае анализ сигналов затруднен наличием шумов, имеющих случайный характер с априорно неизвестными статистическими характеристиками. Уменьшение вклада шумовой составляющей в результаты обработки сигнала достигается алгоритмами фильтрации и сглаживания первичного экспериментального сигнала [3].

Чтобы выбрать адекватные методы сглаживания и фильтрации спектров поглощения следует принять во внимание физические условия измерения спектров, согласно которым термодинамические параметры газовой пробы и состояние измерительного прибора (оптико-акустического газоанализатора) в процессе измерения остаются неизменными. Учет этих особенностей сигнала (спектров поглощения) позволяет выбирать методы фильтрации сигналов со стационарным шумом. Для таких шумов, в частности, частотный спектр имеет одинаковый состав как на всем интервале измерения спектра поглощения, так и на его частях.

Материалы и методы исследования. В соответствии с литературными данными о составе выдыхаемого воздуха у различных групп пациентов [4,5] были синтезированы с использованием базы данных Nitran спектры поглощения выдыхаемого воздуха для здоровых лиц и пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. Состав был выбран следующим образом: 1% H₂O, 5% CO₂, 0,3 ppm N₂O, 1,5ppm CO, 1,7ppm CH₄ – для здоровых лиц; 0,9% H₂O, 3,5% CO₂, 1,1ppm N₂O, 5ppm CO и по 20ppm H₂O₂ и C₂H₆.

Сравнивая модельные сигналы здорового человека и пациента с ХОБЛ (рис. 1) можно заметить, что разница в амплитудах в низкочастотной части спектра около 10% от максимальной амплитуды спектра здорового человека и порядка 30% - для высокочастотной части спектра. Можно предположить, что если шум будет превышать этот порог, то диагностика таких данных может быть ошибочна.

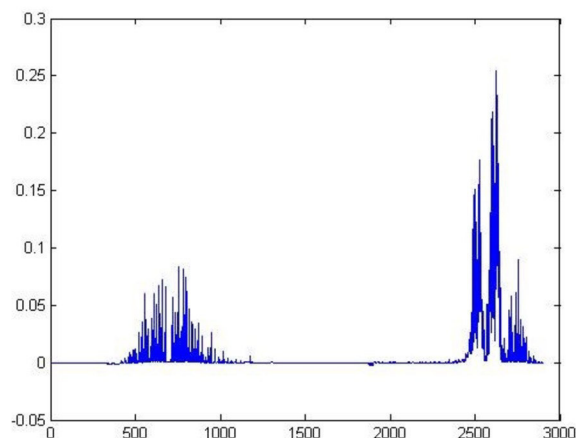


Рис. 1. Разница в амплитудах модельных спектров поглощения выдыхаемого воздуха здорового человека и пациента с ХОБЛ

В качестве алгоритма классификации был использован метод опорных векторов (SVM-метод, от англ. «support vector machine»). Основной идеей метода является перевод исходных векторов в пространство более высокой размерности и поиск разделяющей гиперплоскости с максимальным зазором в этом пространстве. Две параллельных гиперплоскости строятся по обеим сторонам гиперплоскости, разделяющей исследуемые классы. Разделяющей гиперплоскостью будет гиперплоскость, максимизирующая расстояние до двух параллельных гиперплоскостей. Алгоритм работает в предположении, что чем больше разница или расстояние между этими параллельными гиперплоскостями, тем меньше будет средняя ошибка классификатора.

Для подавления шумов были использованы следующие фильтры: медианный, Баттерворта, дискретная фильтрация с помощью фильтра Савицкого—Голея. Для проверки работы фильтров модельный сигнал был зашумлен посредством аддитивного добавления белого шума разной амплитуды.

Результаты. Результаты анализа показывают, что медианный фильтр негативно сказывается на классификации данных, при увеличении окна медианного фильтра ошибка классификации возрастает. При использованных параметрах фильтр Савицкого-Голея – увеличивает специфичность, однако уменьшает чувствительность. При использованных параметрах фильтр Баттерворта 2-го порядка увеличивает специфичность и чувствительность.

Заключение. Результаты анализа показывают, что в задаче неинвазивной диагностики бронхолегочных заболеваний на основе спектрального анализа выдыхаемого воздуха методами ИК спектроскопии и хемометрики предварительная фильтрация экспериментальных данных фильтром Баттерворта 2-го порядка увеличивает специфичность и чувствительность.

Следует отметить, что шум со значениями более 10% не типичен для экспериментальных данных, однако различия в экспериментальных спектрах поглощения также могут быть существенно меньше. В соответствии с данными (рис. 1), определяющим являются не абсолютные значения амплитуды шума, а его величина по отношению к различиям в экспериментальных спектрах поглощения.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ, грант № 17-00-00186.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Montuschi P. (2005). Exhaled breath condensate analysis in patients with COPD. Clin. Chim. Acta, no. 356, pp. 22 – 34.
2. Кузнецов А.И., Логачев А.П., Степанов Е.В. Анализ выдыхаемого человеком воздуха методами диодной лазерной спектроскопии // Известия АН СССР. Серия физическая. – 1990. – Т. 54. – № 10. – С. 15 – 21.
3. Айчифер Э.С., Джервис Б.У. Цифровая обработка сигналов. Практический подход. 2-е издание: пер. с англ. — М.: Издательский дом «Вильямс», 2004. – 992 с.
4. Amann A., Lacy Costello B. de, Miekisch W., Schubert J., et al. (2014). The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. J. Breath Res. , no. 8, pp. 034001.
5. Vreman H.J., Mahoney B., Stevenson D.K. (1995) Carbon monoxide and carboxyhemoglobin. Adv. Pediatrics, no. 42, pp. 303–334.

**МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ-
ЛИГАНДОВ ДЛЯ ГАМК_A РЕЦЕПТОРОВ**

Е.А. Иманкулова, К.С. Станкевич

Научный руководитель: профессор, д.х.н. А.И. Хлебников

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050

E-mail: eai14@tpu.ru

**MOLECULAR MODELING OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS-LIGANDS FOR GABA_A
RECEPTORS**

E.A. Imankulova, K.S. Stankevich

Scientific Supervisor: Prof., D.Sc. A.I. Khlebnikov

Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050

E-mail: eai14@tpu.ru

***Abstract.** GABA_A receptor mediates inhibitory neurotransmission in the central nervous system. A lot of compounds modulating GABA_A receptor and, thus, having anxiolytic or sedative effect has been developed. Herein the analysis of interaction between GABA_A receptor, in particular, its benzodiazepine site, and a set of new ligands consisting of ureas, their benzhydryl derivatives and barbituric acid derivatives studied by molecular docking is presented. It was demonstrated that among investigated 49 compounds, B-100 (S) has the highest binding affinity to the benzodiazepine site.*

Введение. Одной из важных фармакологических мишеней среди рецепторов центральной нервной системы является рецептор γ -аминомасляной кислоты подтипа А (ГАМК_A-рецептор). Поиск селективных лигандов ГАМК_A рецептора направлен на создание лекарственных средств для лечения таких болезней как бессонница, тревожность и эпилепсия, а также стимуляции когнитивных процессов [1,2]. Проведенные ранее исследования ряда производных бензгидрил мочевины, мочевины и барбитуровой кислоты показали, что многие из них обладают противосудорожной активностью, в том числе были разработаны такие препараты, как Галодиф и Галонал [3]. Однако, оценка комплементарности полученных соединений активным сайтам ГАМК_A-рецептора не проводилась.

Целью нашей работы является молекулярное моделирование взаимодействия производных бензгидрил мочевины, мочевины и барбитуровой кислоты с ГАМК_A-рецептором.

Материалы и методы. Для определения наиболее достоверной ориентации и конформации лиганда в центре связывания белка-мишени нами проводился молекулярный докинг (виртуальный скрининг) лигандов. При этом учитывается конформационная лабильность лиганда, а также подвижность боковых цепей аминокислотных остатков внутри активного центра.

Для молекулярного докинга использовали модель $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ гетеропентамера ГАМК_A, характеризующуюся высокой точностью и оптимизированную для оценки взаимодействия лигандов с бензодиазепиновым сайтом ГАМК_A [4]. Докинг предварительно оптимизированных лигандов проводился в программном пакете Schrödinger (Glide) в режиме GlideInducedFitDocking, учитывающем

подвижность боковых цепей рецептора, с использованием высокоточной ExtraPrecisionscoringfunction для оценки энергии взаимодействия (Glide, version 6.7, Schrödinger, LLC, NewYork, NY, 2015).

В качестве лигандов использовали такие соединения как: производные барбитуровой кислоты, бензгидрил мочевины и производные мочевины с известными показателями активности: ЭД50 и порог коразоловых судорог.

Результаты и обсуждение. Мы выполнили молекулярный докинг 49 соединений, большинство из которых представлено в виде R- и S-энантиомеров, в бензодиазепиновый сайт ГАМК_A-рецептора. Ключевыми аминокислотами, ответственными за связывание лиганда в данном сайте, являются: α 1F64, α 1R66, α 1L117, α 1R119, α 1T129, α 1R131, β 2Y97, β 2E155, β 2Y157, β 2F200, β 2S201, β 2T202, β 2G203, β 2Y205, β 2R207 [4].

Мы обнаружили, что наиболее активные соединения среди исследуемых также взаимодействуют с этими аминокислотами. По результатам докинга соединение В-100 (S) обладает наибольшим сродством к бензодиазепиновому сайту связывания ГАМК_A-рецептора (Рис.2.). Это можно объяснить образованием множественных водородных связей между гидроксильными группами углеводного фрагмента и аминокислотами в сайте связывания. Также стоит отметить схожее геометрическое расположение ароматического фрагмента В-100 (S) в дальнем участке «кармана» связывания с расположением ароматического фрагмента Диазепам - известного лиганда, связывающегося с ГАМК_A-рецептором в данном сайте.

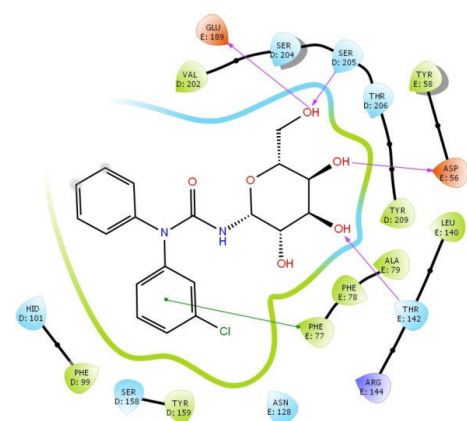
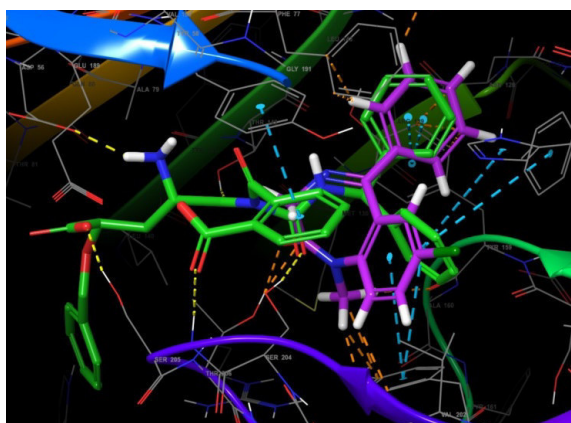


Рис. 1. Геометрия В-100 (S) (зеленым цветом) в бензодиазепиновом сайте связывания ГАМК_A рецептора совмещенная с Диазепамом (фиолетового цвета) и 2D карта отражающая взаимодействие В-100 (S) с аминокислотными остатками в «кармане» ГАМК_A. (D - α 1, E - γ 2): В-100 (S) (GScore -11.14 ккал/моль)

Еще одним соединением, проявляющим высокое сродство к бензодиазепиновому сайту связывания ГАМК_A-рецептора является производное мочевины В-99 (R). Более низкое сродство в сравнении с соединением В-100 (S) можно объяснить различиями в структуре молекул. Расположение большого заместителя В-99 (R) стерически затруднительно в «кармане» ГАМК_A рецептора.

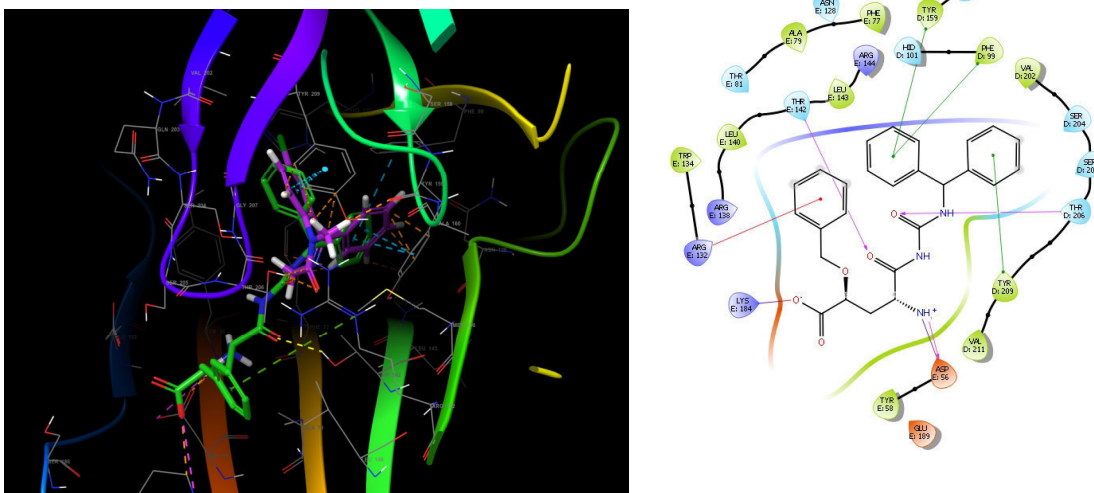


Рис. 2. Геометрия B-99 (R) (зеленым цветом) в бензодиазепиновом сайте связывания ГАМК_A рецептора совмещенная с Диазепамом (фиолетового цвета) и 2D карта отражающая взаимодействие K-32 с аминокислотными остатками в «кармане» ГАМК_A. (D - α1, E - γ2): B-99 (R) (GScore-9.923ккал/моль)

Заклучение. Таким образом, нами был проведен анализ связывания 49 соединений-лигандов производных бензгидрил мочевины, мочевины и барбитуровой кислоты с отдельными аминокислотами ГАМК_A-рецептора и выявлены соединения, которые наиболее комплементарны данному рецептору.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семке В.Я., Новожеева Т.П., Бохан Н.А. Терапия оригинальным антиконвульсантом галодиф влияет на свойства бензодиазепиновых рецепторов тромбоцитов и уровни нейроактивных стероидных гормонов у больных алкоголизмом. // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. Томск 2013. – № 2(75). – С. 73 – 78.
2. Cossart R., Bernard C. & Ben-Ar Y. (2005). Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies [Electronic version]. TRENDS in Neurosciences. no.2. pp. 108-115.
3. Olsen R.W. (2015). Allosteric Ligands and Their Binding Sites Define γ-Aminobutyric Acid (GABA) Type A Receptor Subtypes [Electronic version]. Advances in Pharmacology. no. 73, pp. 167-202.
4. Rikke B., Kongsbak K., Sørensen P. L., Sander T., Balle T. A. (2013). Unified Model of the GABA_A Receptor Comprising Agonist and Benzodiazepine Binding Sites [Electronic version]. PLoS One. no.8(1).

**ИНДЕКС МЕТИЛИРОВАНИЯ ИМПРИНТИРОВАННЫХ ГЕНОВ *GNAS* И *GRB10* ПРИ
НАРУШЕНИЯХ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА**А.А. Кадралиева¹Научный руководитель: к.б.н. Е.А. Саженова²¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

²НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН,

Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10, 630090

E-mail: aly.kadralieva@gmail.com**METHYLATION INDEX OF IMPRINTED *GNAS* AND *GRB10* GENES IN ABNORMAL HUMAN
EMBRYO DEVELOPMENT**A.A. Kadralieva¹Scientific supervisor: E.A. Sazhenova, PhD²¹National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina str. 36, 634050²Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of
Sciences, Russia, Tomsk, Nab. Ushaiki str. 10, 630090E-mail: aly.kadralieva@gmail.com

Abstract. *The present study analyzes the methylation index of the imprinted *GNAS* and *GRB10* genes in the group of the first trimester spontaneous abortions with normal karyotype. The DNA samples derived from extraembryonic mesoderm of 47 spontaneous abortions and 45 induced abortions were examined. A significant increase in the methylation index of the imprinted *GNAS* gene and a decrease in the *GRB10* in the spontaneous abortions were observed. Based on the function of this imprinted genes, it can be assumed that an increase in the methylation index of the *GNAS* gene and its decrease in the *GRB10* could enhance the suppression of embryo growth and lead to a possible disturbance of embryo development.*

Введение. Одной из актуальных проблем современного акушерства является невынашивание беременности, которая, по некоторым оценкам, охватывает примерно 25% супружеских пар репродуктивного возраста, при этом в структуре самопроизвольного прерывания неуклонно растет доля неразвивающейся беременности первого триместра [1].

«Размножение» человека контролируется как генетическими механизмами, так и эпигенетическими факторами регуляции генной экспрессии, одним из которых является геномный импринтинг – особый вид регуляции активности генов в зависимости от родителя, от которого данный ген получен. Геномный импринтинг играет ключевую роль в обеспечении нормального эмбрионального развития и может оказывать влияние на степень экспрессии генов, контролирующих рост эмбриона, процессы пролиферации и дифференцировки клеток и другие процессы внутриутробного развития плода [2]. Механизмы импринтинга преимущественно связаны с дифференциальным метилированием промоторных регионов импринтированных генов и регуляторных последовательностей (центров

импринтинга), устанавливаемым строго специфичным образом в гаметогенезе и поддерживаемым в соматических клетках на протяжении всего онтогенеза [3].

Нарушение дифференциального метилирования импринтированных генов приводит к эпимутациям, которые могут быть представлены как aberrантным гиперметилированием экспрессируемого аллеля, так и, напротив, гипометилированием инактивированного аллеля. В первом случае происходит полная потеря продукта импринтированного гена в клетке, тогда как во втором – наблюдается увеличение дозы гена вследствие установления его биаллельной экспрессии [4].

Материалы и методы. Для проведения данной работы в качестве материала исследовали образцы внезародышевой (экстраэмбриональной) мезодермы 47 спонтанных абортусов (СА) I триместра с нормальным кариотипом. В качестве контроля была исследована внезародышевая мезодерма 45 медицинских абортусов (МА) I триместра беременности. Внезародышевая мезодерма является производной эпибласта, дающего начало наружному зародышевому листку, поэтому данная ткань ближе по происхождению к эмбриональным структурам, чем другие плацентарные ткани. Продолжительность внутриутробного периода развития определялась по дате последней менструации и составила для СА – $7,64 \pm 1,24$ недель и для МА – $7,69 \pm 1,27$ недель.

Геномную ДНК выделяли из некультивированных клеток внезародышевой мезодермы после стандартной обработки протеиназой К при 37°C и экстракцией фенол/хлороформом.

Для бисульфитной конверсии ДНК использовали набор EZ DNA methylation Direct Kit («Zymo Research», США) согласно протоколу производителя. Индекс метилирования определяли путем пиросеквенирования пяти CpG-динуклеотидов для гена *NESP55* и восьми для *GRB10*, расположенных в ДМР, на пиросеквенаторе PyroMark Q24 («Qiagen», Германия).

Результаты. Индекс метилирования был определен в пяти CpG-сайтах гена *GNAS* и в восьми CpG-сайтах гена *GRB10* внутри групп медицинских и спонтанных абортусов (табл. 1, 2).

Для гена *GNAS* в контрольной выборке минимальный и максимальный индекс метилирования составил 26,6% и 70,9%, и был обнаружен в пятом CpG. Среди спонтанных абортусов данные показатели составили 32,7% в пятом CpG и 84,4% в четвертом CpG, соответственно (табл. 1). Увеличение индекса метилирования может приводить к снижению экспрессии гена, а значит к уменьшению количества продуцируемого белка.

Таблица 1

Значение индекса метилирования гена *GNAS* в группе индуцированных и спонтанных абортусов

CpG-сайты	Индекс метилирования (МА)			Индекс метилирования (СА)			p
	значение			Значение			
	мин.	макс.	среднее	мин.	макс.	среднее	
CpG1	29,6	66,5	$43,5 \pm 8,3$	36,2	75,3	$49,9 \pm 7,1$	<0,01
CpG2	29,5	65,5	$43,2 \pm 8,6$	35,8	79,8	$50,0 \pm 8,1$	<0,01
CpG3	29,9	62,1	$41,7 \pm 7,7$	39,9	76,4	$49,7 \pm 7,6$	<0,01
CpG4	29,4	64,6	$43,0 \pm 8,3$	35,7	84,4	$49,5 \pm 8,0$	<0,01
CpG5	26,6	70,9	$42,3 \pm 11,3$	32,7	73,5	$47,7 \pm 9,8$	<0,05
CpGcp	29,3	65,1	$42,7 \pm 9,6$	37,7	77,9	$49,4 \pm 7,8$	<0,01

Примечание: мин. – минимальное значение индекса метилирования, макс. - максимальное значение индекса метилирования, CpGcp – среднее значение индекса метилирования по пяти CpG.

Индекс метилирования гена *GRB10* в контрольной группе варьировал в пределах от 29,5% в четвертом CpG до 71,0% в пятом CpG. В выборке СА минимальное значение этого показателя соответствовало 20,0% в четвертом, максимальное 59,5% в восьмом CpG (табл. 2). Снижение индекса метилирования гена *GRB10* могло привести к увеличению экспрессии данного гена, а значит к увеличению количества белка.

Таблица 2

Значение индекса метилирования гена *GRB10* в группе индуцированных и спонтанных эмбрионов

CpG-сайты	Индекс метилирования (МА)			Индекс метилирования (СА)			p
	значение			Значение			
	мин.	макс.	среднее	мин.	макс.	среднее	
CpG1	42,0	64,5	51,3±6,1	21,9	49,3	37,9±7,7	<0,01
CpG2	42,7	64,9	49,8±5,2	29,2	55,0	41,8±7,6	<0,01
CpG3	42,1	60,6	49,3±9,2	27,2	54,3	41,7±8,1	<0,01
CpG4	29,5	65,4	49,5±6,9	20,0	55,5	41,1±9,1	<0,01
CpG5	38,9	71,0	50,5±6,5	25,8	58,4	39,9±9,4	<0,01
CpG6	41,3	63,1	50,4±5,0	24,3	57,2	41,3±8,4	<0,01
CpG7	36,0	67,0	50,4±6,2	23,9	57,5	40,7±7,8	<0,01
CpG8	34,4	60,4	50,3±5,8	20,4	59,5	41,0±8,5	<0,01
CpGcp	49,3	51,3	50,2±4,4	36,9	41,9	40,6±6,5	<0,01

Примечание: мин. – минимальное значение индекса метилирования, макс. – максимальное значение индекса метилирования, CpGcp – среднее значение индекса метилирования по восьми CpG.

Заключение. В настоящем исследовании обнаружены статистически значимые отличия по индексу метилирования импринтированных генов между спонтанными и медицинскими абортусами, которые свидетельствует о том, что в пренатальном периоде происходит отбор против эмбрионов с подобными нарушениями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Радзинский В.Е. Независящая беременность. Методические рекомендации МАРС. – М.: Редакция журнала Status Praesens, 2015. – 48 с.
2. Elhamamsy A.R. (2017). Role of DNA methylation in imprinting disorders: an updated review. J Assist Reprod Genet, Vol. 34, no. 5, pp. 549-562.
3. Adalsteinsson B.T., Ferguson-Smith A.C. (2014). Epigenetic control of the genome-lessons from genomic imprinting. Genes, Vol. 5, no. 3, pp. 635-655.
4. Лебедев И.Н., Саженова Е.А. Эпимутации импринтированных генов в геноме человека: классификация, причины возникновения, связь с наследственной патологией // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 10. – С. 1356–1373.

ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ИНГИБИТОРА TDP1

Е.О.Казакова

Научный руководитель: профессор, д.х.н. А.А. Бакибаев

Научный консультант: начальник отдела фармакологических исследований (ОФИ) ООО «Ифар»

В.В.Быков

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: kazakova.e.o@mail.ru

PILOT STUDY OF ACUTE TOXICITY OF TDP1 INHIBITOR

E.O.Kazakova

Scientific Supervisor: Professor, PhD A.A.Bakibaev

Scientific adviser: Head of the Department of Pharmacological Research (DPR) ООО "Iphar"

V.V.Bykov

National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: kazakova.e.o@mail.ru

Abstract. *To date, malignant neoplasms are the most pressing medical and social problem both in our country and abroad, despite the introduction of innovative technologies in diagnostics, therapy, and prophylactics. Lung cancer is the most common malignant neoplasm worldwide. Since the beginning of the twentieth century, the incidence of lung cancer has increased, and its growth is especially pronounced in industrially developed countries, where it ranks first in the structure of cancer morbidity. In Russia, over the last ten years, the incidence of lung cancer has decreased, but yet more than 1000000 new cases are diagnosed annually, and lung cancer by remains in first place among all malignant neoplasms among men. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (Tdp1) that result in stalled Top1 are commonly employed against cancer. Nowadays, major methods are used for the treatment of patients with lung cancer: surgery, radiation, chemoradiation, drugs, and combined methods. Combination chemotherapy with DNA repair inhibitors can potentially improve response to these widely used chemotherapeutics.*

Введение. Злокачественные новообразования — одна из основных проблем, стоящих на повестке дня современной медицины, и основная причина возрастающей смертности населения развитых и развивающихся стран [1]. Рак легких во многих индустриально развитых странах представляет одну из самых актуальных проблем онкологии. Данное заболевание является наиболее частой злокачественной опухолью и основной причиной смерти от онкологических заболеваний. Стремительное нарастание заболеваемости, поражающее наиболее трудоспособный контингент населения, не связанное с увеличением продолжительности жизни людей и улучшением диагностики, носит характер эпидемического бедствия, поэтому является не только медицинской, но и государственной социальной проблемой. От рака легкого ежегодно умирает более 2 млн. человек. В настоящее время во многих государствах рак легкого является основной причиной смертности населения от онкологических заболеваний [2]. В настоящее время рак легкого занимает ведущее место в структуре онкологической

заболеваемости населения России, а заболеваемость злокачественными образованиями органов дыхательной системы не имеет тенденции к снижению. Каждая четвертая злокачественная опухоль, выявляемая у мужчин, и каждая двадцатая у женщин, являются новообразованиями трахеи, бронхов, легкого. В общей структуре онкологической заболеваемости России злокачественные новообразования данной локализации занимают 3-е место (10,2%) в списке ведущих локализаций в общей структуре онкологической заболеваемости, в то время как среди мужского населения страны данное заболевание занимает первое место (17,8%) [3]. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) является перспективной мишенью для лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Ингибитор Tdp 1 – один из ключевых ферментов репарации, который перспективным путем увеличивает успешность терапии цитостатиками рака легкого [4]. Изучение острой токсичности – токсичности при однократном введении – является составной частью доклинических исследований новых фармакологических средств. Однако для планирования качественного дизайна необходимо проводить пилотное исследование. Это позволит получить данные необходимого качества и минимизировать количество животных в основном исследовании. Полученные данные будут необходимы для разработки дизайна последующих исследований, в том числе дизайна фармакокинетики. Целью настоящей работы явилось пилотное исследование острой токсичности ингибитора Tdp1.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали соединение Tdp1 – препарат комплексной терапии с цитостатиками – топотеканом и доксорубицином. Исследование проведено на мышах стока CD-1. Для пилотного исследования было использовано 4 группы животных (по 6 животных в группе) согласно таблице 1.

Таблица 1

Дизайн пилотного исследования острой токсичности ингибитора Tdp1

Группа	Доза мг/кг	Объем введения, мл	Пол животных
1	0 (плацебо)	1	Самцы
2	300		
3	0 (плацебо)		Самки
4	420		

Объект исследования вводился внутривенно в объеме 1 мл, максимально допустимом объеме на один прием для мышей. Проводился клинический осмотр и взвешивание животных в течение 14 дней, фиксировалась смертность.

Результаты. В процессе измерения массы тела мышей в течение 14 дней после введения ингибитора Tdp1 статистически значимых изменений выявлено не было (табл.2).

Таблица 2

Динамика изменения средней массы мышей в группе в течение 14 дней
после введения объекта исследования

Пол	Группа	Масса, г										
		0	1	2	3	6	7	8	9	10	13	14
Самцы	1 (0 мг/кг)	33,2 ± 0,9	34,2 ± 0,9	34,6 ± 0,9	35,0 ± 0,8	32,4 ± 1,2	34,0 ± 0,9	35,2 ± 0,9	35,6 ± 0,8	36,0 ± 0,8	36,2 ± 0,9	36,2 ± 0,8
	2 (320 мг/кг)	35,1 ± 0,4	34,2 ± 0,6	34,8 ± 0,6	35,6 ± 0,7	33,1 ± 1,0	33,3 ± 0,9	34,6 ± 1,1	35,3 ± 1,0	35,8 ± 0,9	35,7 ± 1,0	35,9 ± 0,9
Самки	3 (0 мг/кг)	24,9 ± 0,5	24,8 ± 0,6	25,0 ± 0,8	25,4 ± 0,8	25,6 ± 0,9	25,7 ± 0,8	25,6 ± 0,8	25,6 ± 0,8	25,7 ± 0,8	25,6 ± 0,8	26,1 ± 0,9
	4 (400 мг/кг)	24,0 ± 0,4	24,2 ± 0,5	24,4 ± 0,5	24,4 ± 0,7	24,5 ± 0,6	24,1 ± 0,5	24,3 ± 0,5	24,3 ± 0,4	24,5 ± 0,3	25,0 ± 0,4	25,6 ± 0,5

В результате проведенного исследования ни в одной из групп мышей отклонений в состоянии здоровья выявлено не было, смертности также не зафиксировано (табл. 3).

Таблица 3

Результаты смертности мышей в течение 14 дней после введения объекта исследования

Пол	Доза, мг/кг	Общее число животных	Число погибших животных
Самцы	0	6	0
	320	6	0
Самки	0	6	0
	400	6	0

Заключение. Дозы ингибитора Tdp1: 300 мг/кг для самцов и 420 мг/кг для самок не являются близкими к летальным и не вызывают клинически видимых признаков нарушения здоровья. Эти данные будут необходимы для разработки дизайна основного исследования острой токсичности ингибитора Tdp1 при внутрибрюшинном введении мышам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сушинская Т. В., Жордания К. И., Паяниди Ю. Г. Аналитические аспекты онкологических заболеваний женского населения России // Онкогинекология. – 2015. – № 3. – С. 40-43.
2. Нидюлин В., Эрдниева Б. Об эпидемиологии рака легких // Медицинский вестник Башкортостана – 2009 – Т. 4, № 1 - С. 60-63.
3. Каприн А., Старинский В., Петрова Г. Злокачественные новообразования в России // Минздрава России. – 2017. – № 2. - С. 52-57
4. Речкунова Н. И., Лебедева Н. А., Лаврик О. И. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1–новый участник репарации апуриновых/апиримидиновых сайтов в ДНК //Биоорганическая химия. – 2015. – Т. 41. – №. 5. – С. 531-531.

**INTERRELATION OF THE FINGER INDEX AND THE DEVELOPMENT OF SUBJECT-
COGNITIVE ABILITIES OF SCHOOL CHILDREN**

S.M. Kaitova, I.R Dyo., Sh.R. Arutyunyan

Scientific Supervisor: PhD Kaitova Z.S., RUDN University, Russian Federation, Moscow,

Miklukho-Maklaya str. 8, 117198;

E-mail: zinfira_kaitova@mail.ru

**ВЗАИМОСВЯЗЬ ПАЛЬЦЕВОГО ИНДЕКСА И РАЗВИТИЯ ПРЕДМЕТНО-ПОЗНАВАТЕЛЬНЫХ
СПОСОБНОСТЕЙ ШКОЛЬНИКОВ**

С.М. Каитова, И.Р. Дьё, Ш.Р. Аругюнян

Научный руководитель: к.м.н., доцент З.С. Каитова

РУДН, Россия, Москва, ул Миклухо-Маклая 8, 117198;

E-mail: zinfira_kaitova@mail.ru

Аннотация. *В настоящее время уделяют серьезное внимание антропологическому исследованию. Нами проведено исследование пальцевого индекса у школьников старших классов. В исследовании принимали участие 24 школьника, из них мальчиков – 10 и девочек – 14; средний возраст – 14,5 лет. Оказалось, что у большинства мальчиков пальцевой индекс ниже единицы. Школьницы с пальцевым индексом единица и выше единицы учатся лучше, занимаются активно спортом, интересуются танцами и музыкой. Однако, достоверной зависимости успехов по русскому языку от пальцевого индекса у школьников не обнаружено. Возможно, полученные данные связаны с маленькой выборкой исследуемого материала.*

Introduction. The success of any activity depends not only on the presence of a particular skill, but also on a combination of different abilities [1]. Human abilities should be divided into two parts: natural (biological) and specific (human). Many of the natural abilities are common in humans and animals: perception, memory, thinking, the ability for elementary communications at the level of expression [1-3]. In addition to natural abilities, humans possess specific abilities that have a socio-historical origin. Thus, human abilities include general and special abilities. Common abilities are those that determine the success of a person in the most diverse spheres of activity. Special abilities provide the person with success in the specific types of activity, for which special types of makings and their development are necessary. Among the special abilities one should distinguish educational and creative, theoretical and practical, subject-cognitive and interpersonal ones and etc. [4-6]. To measure the degree of the development of abilities there is a system of tests that increase in difficulty, which is called the "battery of tests" [2, 4, 7].

According to E.A. Klimov (2004), all human occupations can be divided into the following types: nature – human being (professions related to the study of living and inanimate nature, etc.); technology - human being (professions related to the creation, installation, assembly and adjustment of technical means, etc.); human being – human being (occupations related to medical care and legal protection of a person); human being - sign information (professions related to texts, figures, formulas, and tables, with drawings, maps, diagrams, audio signals); human being - artistic image (professions related to the creation, design, modeling of works of art, the manufacture of various products according to a sketch, a model, etc.) [1].

Nowadays, not all the graduates of high schools are prepared for the "adult" life and can independently implement the choice of the profession and realize the further education associated with it. It is difficult for high school students to orient themselves in various professional aspects [4, 6, 8]. Quite often a high school student while choosing a profession relies on someone else's experience, that is, information received from parents, acquaintances, from the media or Internet resources. Often, this choice leads to a feeling of personal dissatisfaction and a low level of professional adaptation.

The research questionnaires did not include a detailed study of the location of the pattern on fingers and on the skin of a palm. Schoolchildren selection was random and not entirely reliable, in order to reveal a clear pattern between personality traits and dermatoglyphic patterns. The purpose of the study was to identify the possible relationship between the finger index and the educational and cognitive inclinations of schoolchildren.

Materials and methods. Two main methods were used: questioning and finger index. The students of the 8th grade took part in the study. There were 24 children in total, 10 of them - boys and 14 - girls. The average age was 14.5 years. The questionnaire included the following questions: age and gender, academic achievement in mathematics and the Russian language, general academic performance, sports, music, vocals, dancing, drawing, hobbies and other items. Schoolchildren filled the questionnaires by themselves. They measured the length of the index, ring fingers, and calculated the finger index (the ratio of the length of the index finger to the length of the ring finger (2D: 4D)). The measurement was carried out only with the right hand, since all the children were right-handed.

Discussion. According to statistics, 25% of women have the equal length of the index (2D) and the ring finger, that is, the finger index corresponds to one. In 45% of women, the index (2D) is longer than the ring finger. Also 52% of males usually have longer ring finger (4D), that is, the finger index is less than one. The data obtained by us correspond to general statistics. The 80% of school girls have a finger index higher or equal to one. While 50% of schoolchildren have a finger index less than one.

Schoolgirls. Of the 14 investigated: 2D is longer in 4; The finger index (2D: 4D) is equal to one in 5 girls; 4D is longer in 5 schoolgirls. Overall academic performance: "Satisfactory" - 6; "Good" - 6; "Excellent" - 2. Russian language performance is better for girls with a finger index of one or higher. It is revealed that 10 schoolgirls out of 14 are engaged in sports and all have an index finger longer than a ring finger. It turned out that all the girls who are fond of music and dancing (4), singing (5), or study in the art school (5), have the index finger longer than the ring finger, that is, the finger index is higher than one.

Schoolboys. Out of 10 studied students, the index finger (2D) is longer in 4 boys, and the ring finger (4D) is longer in 6 pupils. It was revealed that the overall academic performance was "Satisfactory" in 3; "Good" - 5; "Excellent" - 2. The best performance in the Russian language and mathematics is noted in children with a long ring finger, that is, the finger index is less than one. Eight schoolchildren are engaged in sports, 5 of them have a ring finger (4D) longer than an index finger. Also revealed that all boys with a finger index above one (3) are interested in music.

Conclusions. Girls with a finger index equal to one (2D: 4D) learn better, do sports, are interested in dancing and music. Boys with a finger index less than one are engaged in sports and their overall academic performance is higher. Boys with a finger index above one are fond of music. We have not identified a reliable dependence of academic performance on the Russian language or on mathematics from the finger index. Perhaps

the results are related to a small sample of schoolchildren. 80% of schoolgirls have a finger index higher or equal to one. While 50% of schoolchildren have a finger index less than one.

Schoolchildren of the same class participated in the work. Children study together since elementary school and are already used to a psychological social atmosphere. Their school is ethnic, multinational and multicultural and where schoolchildren feel comfortable. They have been learning Korean from the first grade, and English - from the second grade. All children belong to an equivalent social group. Thus, the low overall academic performance in this group is due only to children's "self-indulgence". In addition, the lack of a significant dependence of students' success in subjects on the finger index is associated with the need to expand research methods. It is required to develop the dynamic monitoring of this group and organize practical recommendations for students in choosing a profession.

REFERENCES

1. Klimov, E. A. (2004) Psychology of professional self-determination: Textbook. MO RF. - St. Petersburg: Academy, p. 301.
2. Bogdanov, N. N., Solonichenko, V. G. (2002) History and main tendencies of development of dermatoglyphics. Identification and definition of personality characterization (dactyloscopy and dermatoglyphics). -M., pp. 36-58.
3. Gertrud, I. (2006) Hürlimann. Signs of hands - about the nature and type of personality: St. Petersburg. Publishing group "Weight", pp. 172-177.
4. Titova, Ye. P. (1975) Sexual development of adolescent girls with different somatotypes. Differential psychophysiology and genetic aspects. Theses of the symposium.
5. Lyakh, V. I. (2000) The motor abilities of schoolchildren: the fundamentals of theory and methods of development. M.: Terra-Sport, p. 192.
6. Klimov E. A., (2003) Anatomic-morphological patterns of the variability of a person's personality with a human sense and their interaction with a dermatological bond: Author's abstract, p. 50.
7. Edzhubova, Bogdanova, Kh. Nikitina, T. M., Kochetkova, N. I., Isaak, S. I. (2002) Finger Dermatographic and Physical Features. Papillary Patterns: Identification and Definition of Personality Characteristics (ed.), pp. 113-135.
8. Solonichenko, V. G., Bogdanov, N. N. (2002) Medical dermatoglyphics. Identification and definition of personality characterization (fingerprinting and dermatoglyphics), pp. 59-80.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ ЛАКТОНОВ**

О.А. Кайдаш, Ю.А. Пфаргер

Научный руководитель: профессор, д.м.н. А.И. Венгеровский

Сибирский государственный медицинский университет,

Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050

E-mail: kaidash_2011@mail.ru

MOLECULAR TARGETS OF HYPOLIPIDEMIC ACTION OF SESQUITERPENE LACTONES

O.A. Kaidash, Yu.A. Pfarger

Scientific Supervisor: Prof., PhD A.I. Vengerovskii

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovskii tract, 2, 634050

E-mail: kaidash_2011@mail.ru

Abstract. *Experiments on rats with hyperlipidemia model induced by cholesterol-rich diet during 4 weeks showed that the daily treatment with sesquiterpene lactone grossgemin and ludartin in doses 10 mg/kg for a period of 14 days led to decrease hypertriglyceridemia, fat acids, common cholesterol and low density lipoproteins cholesterol serum content. Grossgemin and ludartin in the liver increase the expression of mRNA genes that code acyl-Co A: cholesterol acyltransferase, cholesterol-7 α -hydroxylase, carnitin-palmytoyltransferases 1 and 2. Grossgemin increase the expression of mRNA gene 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Co A reductase.*

Введение. Многочисленные международные исследования убедительно доказали, что смертность от сердечно-сосудистых заболеваний напрямую зависит от степени дислипидемии [1]. Сесквитерпеновые лактоны представляют собой самую обширную группу терпеноидов и обладают различными видами фармакологической активности. Гроссгемин оказывает гиполипидемическое действие у крыс на модели гиперлипидемии, вызванной оливковым маслом, этанолом и тритоном WR 1339. Сесквитерпеновый лактон арглабин на модели острой гиперлипидемии, вызванной этанолом, снижает в сыворотке крови крыс содержание ТГ, ХС, ХС-ЛНП, свободных жирных кислот (ЖК) и индекса атерогенности [2]. Цель настоящего исследования — изучение механизмов гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона гроссгемина и людартина на модели хронической гиперлипидемии, вызванной диетой, обогащенной ХС.

Материалы и методы исследования. Гроссгемин (3-оксо-8-гидрокси-1,5,7 α ,4,8 β (H)-гвай-10(14),11(13)-диен-12,6-олида) и людартин (3,4 α -эпокси-5,7 α (H),6 β (H)-гвай-1(10),11(13)-диен-12,6-олида) – сесквитерпеновые лактоны гваянового типа, выделенные в АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия». Количественное содержание лактонов в исследуемых препаратах составляет не менее 98%. Эксперименты выполнены на 40 белых крысах самцах линии Wistar первой конвенциональной категории массой 280 – 320 г, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга» Томского НИМЦ (Томск). Животные в течение 4 недель получали атерогенную диету (животные жиры с содержанием 2,5 % ХС, 0,5 % холевой кислоты, 0,1 % 2-тиоурацила, 545 ккал/ 100 г). Крысы с уровнем общего ХС 7 – 10 ммоль/л продолжали получать атерогенную диету еще 2 недели. В течение этого времени им вводили в желудок в суспензии в 0,5 % крахмальной слизи гроссгемин, людартин или препарат

сравнения розувастатин кальция (Sigma, США) в эффективных дозах 10 мг/кг. Контрольные животные с гиперлипидемией получали только крахмальную слизь, интактные животные — стандартную лабораторную диету «ПроКорм» (БиоПро, Россия) и крахмальную слизь. Крыс после голодания на протяжении 12 ч умерщвляли асфиксией в атмосфере углекислого газа. В сыворотке крови определяли содержание ТГ, ЖК, общего ХС, ХС-ЛНП и ХС липопротеинов высокой плотности (ЛВП). Экспрессию мРНК генов редуктазы ГМГ-КоА А (*Hmgcr*), ацилКо А: холестерин ацилтрансферазы (*Soat1*), холестерин-7 α -гидроксилазы (*Cyp7a1*), карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (*Cpt1a*), карнитин-пальмитоилтрансферазы 2 (*Cpt2*), рецептора ЛНП (*Ldlr*) определяли методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в режиме реального времени, как описано [3]. Результаты обрабатывали с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни и Вилкоксона для независимых и зависимых выборок при вероятности ошибочного вывода, не превышающей 5 % ($p \leq 0,05$).

Результаты. В сыворотке крови животных, получавших в течение 4 недель атерогенную диету, увеличивалось содержание ТГ, ЖК, ХС ЛВП в 1,4 – 2,5 раза, общего ХС и ХС ЛНП — в 5,2 – 5,8 раза ($p < 0,05$) (табл. 1).

Таблица 1

Влияние гроссгемина (10 мг/кг), людартина (10 мг/кг) и розувастатина (10 мг/кг) при введении внутрь 1 раз в сутки в течение 14 дней на содержание триглицеридов, жирных кислот, общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой и высокой плотности в сыворотке крови при экспериментальной гиперлипидемии, вызванной у крыс атерогенной диетой ($X \pm m$, $n = 8$)

Экспериментальные группы	Триглицериды, ммоль/л	Жирные кислоты, ммоль/л	Общий холестерин, ммоль/л	Холестерин ЛНП, ммоль/л	Холестерин ЛВП, ммоль/л
Интактные животные	0,90 \pm 0,13	0,89 \pm 0,06	1,62 \pm 0,25	0,20 \pm 0,10	0,76 \pm 0,07
Модель гиперлипидемии	1,36 \pm 0,13 ¹	1,21 \pm 0,04 ¹	8,49 \pm 1,39 ¹	1,17 \pm 0,17 ¹	1,91 \pm 0,22 ¹
Гиперлипидемия + гроссгемин	0,79 \pm 0,05 ²	0,65 \pm 0,05 ²	3,94 \pm 0,55 ²	0,41 \pm 0,11 ²	1,29 \pm 0,15 ²
Гиперлипидемия + людартин	0,47 \pm 0,05 ²	0,77 \pm 0,06 ²	3,83 \pm 0,44 ²	0,73 \pm 0,08 ²	1,43 \pm 0,18
Гиперлипидемия + розувастатин	0,70 \pm 0,13 ²	0,75 \pm 0,07 ²	3,37 \pm 0,40 ²	0,43 \pm 0,04 ²	1,40 \pm 0,14 ²

Примечание к табл. 1: $p < 0,05$ по сравнению с показателем: ¹ интактных животных, ² при модели гиперлипидемии

При курсовом введении гроссгемина и людартина в дозе 10 мг/кг животным, получавшим атерогенную диету, в сыворотке крови уровень ТГ снижался в 1,7–2,9 раза, ЖК – в 1,6–1,9 раза, общего ХС – в 2–2,3 раза ($p < 0,05$). Количество ХС-ЛНП гроссгемин и людартин снижали в равной степени. При терапии гроссгемином содержание ХС-ЛВП уменьшалось в 1,5 раза, людартин достоверно не изменял данный показатель. (таблица 1).

На фоне атерогенной диеты в печени экспериментальных животных гроссгемин значительно повышал экспрессию гена холестерин-7 α -гидроксилазы, что увеличивает синтез желчных кислот из ХС и выведение его с желчью. Кроме того, при приеме гроссгемина увеличивалась экспрессия мРНК гена карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 и уменьшалась экспрессия гена ацилКоА: холестерин ацилтрансферазы. Экспрессия ГМГ-КоАредуктазы при введении гроссгемина увеличивалась (рис. 1А).

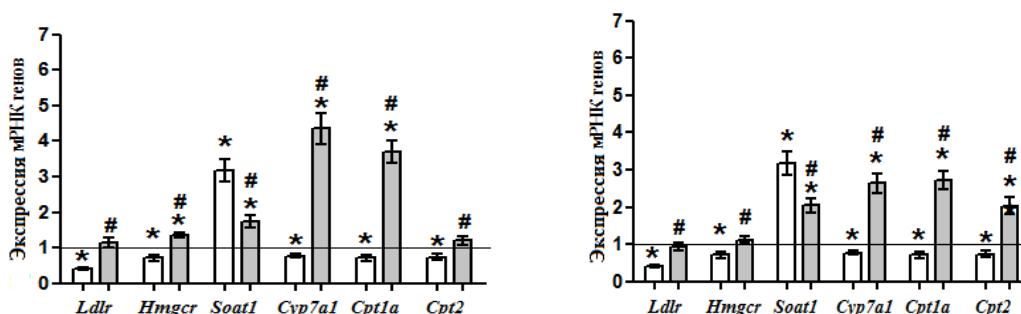


Рис. 1. Влияние гроссгемина (А) и людартина (Б) на экспрессию мРНК генов метаболизма липидов в печени крыс при атерогенной диете

Примечание: □ – атерогенная диета; ■ – атерогенная диета + гроссгемин (А) или людартин (Б). * – статистическая значимость по сравнению с контролем, $p < 0,05$; # – статистическая значимость по сравнению с атерогенной диетой, $p < 0,05$. Обозначение генов: **Ldlr** – ген рецептора ЛНП; **Hmgcr** – ген 3-гидрокси-3-метилглутарил КоА редуктазы; **Soat1** – ген ацилКоА: холестерин ацилтрансферазы; **Cyp7a1** – ген 7- α -гидроксилазы; **Cpt1a** – ген карнитин-пальмитоилтрансферазы 1; **Cpt2** – ген карнитин-пальмитоилтрансферазы 2.

Людартин на фоне атерогенной диеты уменьшал в печени крыс экспрессию мРНК гена ацилКоА: холестерин ацилтрансферазы, повышал экспрессию мРНК генов холестерин-7 α -гидроксилазы, карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 и 2 (рис. 1Б).

Заключение. Сесквитерпеновые лактоны гроссгемин и людартин оказывают в эксперименте гиполлипидемическое действие. Гиполлипидемическое действие гроссгемина и людартина обусловлено модификацией экспрессии генов, кодирующих ферменты и рецепторы, участвующие в метаболизме липидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pirillo, A., Norata G.D., Catapano A. L. (2014). Postprandial lipemia as a cardiometabolic risk factor. *Curr. Med. Res. Opin.*, no. 8, pp. 1489–1503.
2. Ратькин А.В., Кайдаш О.А., Пфаргер Ю.А., Иванов В.В., Адекенов С.М., Рязанцева Н.В., Чучалин В.С., Венгеровский А.И. Гиполлипидемическое действие сесквитерпеновых лактонов арглабина и ахиллина на модели острой гиперлипидемии // *Сибирское медицинское обозрение*. – 2014. – Т. 89. – № 5. – С. 40-43.
3. Кайдаш О.А. Гиполлипидемическое действие сесквитерпеновых лактонов при экспериментальной гиперлипидемии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Томск, 2017. – 24 с.

**ОЦЕНКА ТРАНСМИССИВНОСТИ БЛРС-КОДИРУЮЩИХ ПЛАЗМИД У МОЧЕВЫХ
ИЗОЛЯТОВ E. COLI, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ АМБУЛАТОРНЫХ ПАЦИЕНТОВ**Е.И. Катаева

Научный руководитель: профессор, д.м.н. А.Л. Бурмистрова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Челябинский государственный университет»,

Россия, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129, 454001

E-mail: kataeva3105@mail.ru**EVALUATION OF THE ESBL-CODING PLASMIDS TRANSMISSIBILITY IN E. COLI ISOLATED
FROM AMBULATORY PATIENT'S URINA**E.I. Kataeva

Scientific Supervisor: Prof., Dr. A.L. Burmistrova

Chelyabinsk State University, Russia, Chelyabinsk, Brothers Kashirinykh str., 129, 454001

E-mail: kataeva3105@mail.ru

Abstract. Representatives of the Enterobacteriaceae family are the main causative agents of urinary tract infections. Escherichia coli can exhibit resistance to β -lactam antibiotics by synthesizing ESBL (extended spectrum β -lactamases). CTX-M β -lactamases are the dominant group of ESBL. In this paper, we investigated the ability of E. coli urinary isolates to transmit resistance genes within the plasmid. An analysis of the effectiveness of conjugation has shown that E. coli strains producing ESBL are capable of transferring resistance genes to a recipient bacterium at a high frequency.

Введение. Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) по распространенности занимают второе место в мире, уступая лишь патологиям органов дыхательного тракта. Основными возбудителями внебольничных ИМВП являются представители Enterobacteriaceae, в первую очередь Escherichia coli, которая выделяется из клинического материала больных в более чем 80% случаев [1]. Препаратами выбора при эмпирической терапии таких инфекций являются антимикробные средства, в том числе бета-лактамы антибиотики.

Между тем следует помнить, что E. coli – это микроорганизм, который первично или вторично способен синтезировать ряд бета-лактамаз, разрушающих определенные препараты этой группы. Среди известных бета-лактамаз приобретенного происхождения особую значимость имеет группа БЛРС (бета-лактамазы расширенного спектра), ферменты которой различаются субстратным профилем и кодируются рядом генов, локализующихся на плазмидах [2].

В настоящее время, в России и ряде других стран Европы, Азии и Южной Америки, СТХ-М бета-лактамазы являются доминирующей группой БЛРС [3]. Частота встречаемости E. coli с таким механизмом устойчивости особенно высока среди госпитальных возбудителей, что связано с повышенным потреблением современных бета-лактамы антибиотиков в стационарах. Среди амбулаторных пациентов процент СТХ-М-продуцирующих E. coli не велик. Однако, по данным иностранных авторов, ряд последних лет характеризуется стремительным их увеличением [3, 4]. Это,

вероятно, связано с конъюгативными свойствами плазмид, на которых локализируются гены резистентности. В источниках отечественной научной литературы такие данные представлены единично.

В связи с вышеуказанным, целью нашей работы являлась оценка трансмиссивности БЛРС-кодирующих плазмид *E. coli*, выделенных из мочи амбулаторных пациентов.

Материалы и методы. Исследования проводили в учебной лаборатории микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет» на базе бактериологической лаборатории МБУЗ ГКБ № 6 г. Челябинска в период январь – декабрь 2017 года.

Для эксперимента производили отбор этиологически значимых штаммов *E. coli*, выделенных из мочи амбулаторных пациентов с ИМВП. Всего исследовано 254 штамма. Идентификацию выполняли с помощью тест-системы «ENTEROtest 24» («LaChema, Чехия).

Антибиотикочувствительность выделенных штаммов определяли диско-диффузионным методом в соответствии с клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (2015г.). Фенотипическое обнаружение БЛРС осуществляли согласно МУК 4.2.1890-04.

Выявление генов СТХ-М у БЛРС-положительных штаммов выполняли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора «Резистентность к цефалоспорином – 1 (гены СТХ-М)» («Литех», Россия).

Оценку трансмиссивности БЛРС-кодирующих плазмид от клеток-донора к клеткам-реципиента выполняли по методическим рекомендациям для постановки конъюгации [5]. В исследовании использовали суточные культуры следующих штаммов: цефотаксим-резистентные клинические штаммы *E. coli* (донор), штамм *E. coli* 2320 СТХ-М-42 (контрольный донорный штамм) и штамм *E. coli* АВ 1456 Rif^R (реципиент). Конъюгацию проводили в жидкой среде (бульон Мюллера-Хинтон), используя начальное соотношение суточных культур донора и реципиента 1:2. Для дифференциации колоний трансконъюгантов, донора и реципиента, культуры высевали на чашки с агаром Мюллера-Хинтон с добавлением антибиотиков: рифампицин, цефотаксим и рифампицин+цефотаксим. Эффективность конъюгации рассчитывали как отношение количества колоний трансконъюгантов на чашках с рифампицином и цефотаксимом к количеству колоний реципиента на чашках с рифампицином. Параллельно проводили высева на селективные среды донорных культур для оценки частоты спонтанных мутаций устойчивости к рифампицину и культуры реципиента для оценки частоты спонтанных мутаций устойчивости к цефотаксиму, и в качестве отрицательного контроля конъюгации.

Для подтверждения наличия генов СТХ-М у полученных в ходе конъюгации трансконъюгантов проводили идентификацию генетических детерминант методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора «Резистентность к цефалоспорином – 1 (гены СТХ-М)» («Литех», Россия).

Статистическую обработку данных выполняли методом оценки значимости средних величин.

Результаты. В ходе фенотипической оценки были выделены 35 (14%) штаммов *E. coli*, продуцирующих БЛРС. ПЦР-анализ подтвердил наличие генов СТХ-М β –лактамаз у 17 изолятов. Исследование возможности передачи генов СТХ-М при конъюгации показало, что 14 из 17 штаммов *E. coli* способны передавать плазмиду, кодирующую исследуемый ген. ПЦР-анализ полученных трансконъюгантов подтвердил наличие гена у 10 штаммов. Отсутствие гена у остальных трансконъюгантов, возможно, объясняется наличием спонтанных мутаций у реципиента. По данным

эксперимента рассчитали эффективность конъюгационного процесса, значения которого представлены в таблице 1.

Эффективность конъюгации исследованных штаммов E. coli

Таблица 1

№ п/п	Номер штамма	Эффективность конъюгации, $p < 0,05$	№ п/п	Номер штамма	Эффективность конъюгации, $p < 0,05$
1	338	0,250±0,005	8	381	0,024±0,001
2	903	0,033±0,002	9	655	0,032±0,001
3	642	0,024±0,001	10	681	0,026±0,001
4	841	0,030±0,001	11	842	0,042±0,002
5	809	0,166±0,007	12	214	0,038±0,005
6	488	0,030±0,001	13	432	0,333±0,008
7	737	0,026±0,001	14	153	0,027±0,001

Заключение. Проведенные нами исследования показали, что штаммы E. coli – продуценты БЛРС, содержащие гены CTX-M, встречаются при внебольничных инфекциях мочевыводящих путей. Данные штаммы способны к горизонтальной передаче этих генов резистентности. Распространение приобретенной устойчивости к бета-лактамам антибиотикам среди этиологически значимых штаммов E.coli посредством передачи плазмид, вероятно, является одной из нарастающих проблем, требующих тщательного изучения и поиска возможных путей ее преодоления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Палагин, И.С. Современное состояние антибиотикорезистентности возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты исследования «ДАРМИС» (2010-2011) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14. – № 4. – С. 280–302.
2. Эйдельштейн, М.В. β-лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – № 3. – С. 223–242.
3. Canton, R., Coque T.M. (2006). The CTX-M b-lactamase pandemic [Electronic version]. Current Opinion in Microbiology, no. 9, pp. 466 – 475.
4. Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski M. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe [Electronic version]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, no. 59 (2), pp. 165 – 174.
5. Степанова, М. Постановка конъюгации // Бета-лактамазы: значение и методы выявления: материалы научно-практического семинара. – Смоленск, 2005. – С. 24 – 25.

**РОЛЬ STABILIN-1 ПОЗИТИВНЫХ МАКРОФАГОВ В ПОСТИНФАРКТНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ
МИОКАРДА**

Б.Е. Ким¹

Научные руководители: профессор, д.м.н. Е.Г. Чурина^{1,2}, профессор, д.м.н. В.В. Рябов^{1,2}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

²Сибирский государственный медицинский университет

Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050

E-mail: kim_boris@list.ru

**ROLE OF STABILIN-1 OF POSITIVE MACROPHAGES IN POSTMYOCARDIAL INFARCTION
REGENERATION OF THE MYOCARDIUM**

B.E. Kim¹

Scientific Supervisors: Prof., MD, Dr. E.G. Churina, Prof., MD, Dr. V.V. Ryabov

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin Ave., 36, 634050

²Siberian State Medical University, Russia, 634050, Tomsk, Moskovsky Trakt, 2

E-mail: kim_boris@list.ru

Abstract. *Remodeling of heart and developing thereof a heart failure still is one of the main reasons for fatal outcomes of the patients who carried a myocardial infarction. Led need of increasing knowledge of the factors leading to various outcomes of a myocardial infarction to the shift of accent of scientific interest towards studying of a phenotype of resident cages of immune system (macrophages) in different morphological structures of a myocardium depending on a stage of pathological process. There are two subpopulations of macrophages: inflammatory M1, in charge of extermination of stranger agents as directly, and due to engaging and activation of other cages of immune system and M2 the macrophages performing adaptive, regenerator and antiinflammatory functions. One of markers of M2 of macrophages is the membranous glycoprotein capable to chemically connect the modified lipoproteins of low density – is stabilin - 1.*

Введение. Ремоделирование сердца и развивающаяся вследствие этого сердечная недостаточность по-прежнему является одной из основных причин фатальных исходов больных, перенесших инфаркт миокарда. Необходимость углубления знаний о факторах, приводящих к различным исходам инфаркта миокарда, привело к смещению акцента научного интереса в сторону изучения фенотипа резидентных клеток иммунной системы (макрофагов) в разных морфологических структурах миокарда в зависимости от стадии патологического процесса. Выделяют две субпопуляции макрофагов: воспалительные M1-макрофаги, отвечающие за уничтожение чужеродных агентов как напрямую, так и за счет привлечения и активации других клеток иммунной системы и M2-макрофаги, выполняющие адаптивную, регенераторную и противовоспалительную функции. Макрофаги, помимо различия в выполняемых функциях, обладают свойством пластичности, которое позволяет им изменять свой фенотип и функции в ответ на сигналы микроокружения [1]. Многообразие фенотипов макрофагов требует дальнейшего их изучения [2]. Молекулярные биомаркеры макрофагов, известные на сегодняшний день,

продемонстрировали широкие диагностические возможности [3]. Одним из ключевых маркеров M2-макрофагов является мембранный гликопротеин, способный химически связывать модифицированные липопротеиды низкой плотности и модулировать регуляторные свойства макрофагов – стабилин 1 [4]. Целью настоящего исследования явилось установление роли stabilin-1-позитивных макрофагов в постинфарктной регенерации миокарда.

Материал и методы. В настоящей работе объектом исследования являлись фрагменты миокарда больных, умерших от инфаркта миокарда I типа в течение 2013-2014гг. С парафиновых блоков были приготовлены микротомные срезы для последующего иммуногистохимического исследования. В каждом случае проводился забор от трёх до пяти парафиновых блоков. С каждого блока выполнено двадцать срезов. Срезы фиксировались на стёклах с полилизинным покрытием (по два среза на одно стекло); при этом один из срезов в каждом стекле использовался для отрицательного контроля. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование проводилось на универсальном прямом исследовательском микроскопе. Локализация и давность инфаркта миокарда определяли рутинным гистопатологическим анализом. Исследовали образцы инфарктированного миокарда, перинфарктных зон и областей, отдаленных от инфаркта. Пациенты разделены по группам в зависимости от наступления летального исхода: 1-я группа — умершие в течение первых суток; 2-я — умершие в течение 24-72 часов; 3-я группа — умершие на 4-10-е сутки; и 4-я группа — на 11-21-е сутки. Кроме гистопатологического исследования, оценка макрофагальной инфильтрации производилась методом иммуногистохимического анализа. В качестве основного общего маркера макрофагов был использован CD68, а в качестве маркера M2-макрофагов — стабилин-1. Исследование миокарда проводили с помощью набора мышинных моноклональных антител к CD68 и кроличьих поликлональных антител к стабилин-1. Применяли систему визуализации HRP-DAB (horseradishperoxidase3,3'-diaminobenzidine, пероксидаза-3,3'-диаминобензидин). Количественный анализ проводился двумя независимыми исследователями. Количество CD68 и стабилин-1 макрофагов подсчитано в зоне инфаркта, перинфарктной зоне и зоне отдаленной от инфаркта миокарда. Каждая область оценивалась в 20 случайных полях зрения (микрофотографии x 630). Обработка данных выполнялась с использованием пакета программ “Statistica 10.0”.

Результаты. В инфарктной зоне интенсивность CD68 и стабилин-1 макрофагальной инфильтрации в течение воспалительной фазы была ниже, чем в фазе регенерации. На более поздних сроках (11-21 сутки) содержание CD68 и стабилин-1 макрофагов по-прежнему оставалось высоким (рис. 1).

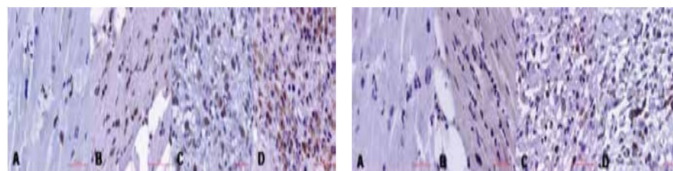


Рис. 1 Динамика сердечных CD68 и стабилин-1 макрофагов в зоне инфаркта миокарда, иммуногистохимия. А — группа 1, В — группа 2, С — группа 3, D — группа 4

Отличная динамика наблюдалась в количестве стабилин-1 макрофагов. В течение воспалительной фазы содержание стабилин-1 макрофагов не изменялось. Количество стабилин-1 макрофагов увеличивалось в регенераторной фазе и было значимо выше в инфарктированном миокарде, чем в перинфарктной и отдаленной от инфаркта зонах. На 11-28-й день течения инфаркта миокарда

интенсивность стабиллин-1 макрофагальной инфильтрации в зоне инфаркта оставалась неизменной и была выше таковой в других зонах. Помимо этого, содержание стабиллин-1 клеток в периинфарктной области было выше, чем в отдаленных от инфаркта участках (рис. 2).

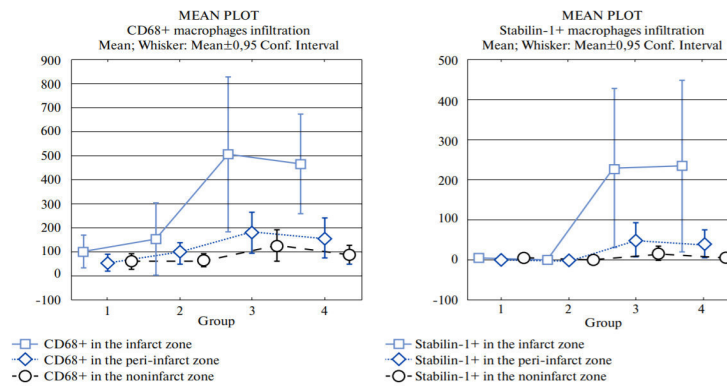


Рис. 2 CD68 и стабиллин-1 макрофаги в зоне инфаркта, периинфарктной зоне и зоне, отдаленной от инфаркта. *Infarct area* — зона инфаркта, *peri-infarct area* — периинфарктная зона, *non-infarct area* — зона, отдаленная от инфаркта

Закключение. M2-макрофаги выполняют противовоспалительные функции и создают условия для процессов заживления повреждений и регенерации. С другой стороны, длительное воздействие повреждающего фактора может приводить к неконтролируемой активации M2-макрофагов и трансформировать их в антагонистов тканевого заживления. Возможно, в настоящем исследовании мы наблюдали чрезмерную активацию M2-макрофагов на поздних сроках инфаркта миокарда вследствие хронизации воспалительного процесса в поврежденной ткани сердца. Полученные данные, во-первых, свидетельствуют о развитии воспалительного иммунного ответа в миокарде в острый период инфаркта и его поддержании на поздних сроках заболевания, обусловленного функциональной пластичностью ключевых клеток-эффекторов воспаления – макрофагов, во-вторых, доказывают участие stabilin-1-позитивных макрофагов в процессе заживления и постинфарктного ремоделирования миокарда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Troidl C., Mollmann H., Nef H, et al. (2009) Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med*, no 13, pp. 3485-3496.
2. Nahrendorf M., Swirski F.K. (2013) Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ Res.*, no 112. pp. 1624-1633.
3. Kzhyshkowska J. (2010) Multifunctional receptor stabilin-1 in homeostasis and disease. *Scientific World Journal*, no 10, pp. 2039-2053.
4. Гомбожапова А.Э., Роговская Ю.В., Ребенкова М.С. и др. Стабиллин-1-позитивные макрофаги в миокарде пациентов с фатальным исходом инфаркта миокарда // *Сибирский медицинский журнал*. - 2016. - Т. 3. - С. 100-103.

**ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ПЛОДОВ АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ (*ARONIA MELANOCARPA*
(*MICHX.*) *ELLIOT*) НА ЭРИТРОИДНЫЙ РОСТОК КРОВЕТВОРЕНИЯ В УСЛОВИЯХ
ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ**

К.М.Кириленко, О.Ю. Рыбалкина

Научный руководитель: к.б.н. О.Ю. Рыбалкина

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д.Гольдберга
Томского НИМЦ

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634028

E-mail: kirillkirilenkotomsk@gmail.com

**THE EFFECT OF THE BLACK CHOKEBERRY FRUIT EXTRACT (*ARONIA MELANOCARPA*
(*MICHX.*) *ELLIOT*) ON THE THE HEMATOPOIETIC ERYTHROID LINEAGE UNDER
CONDITIONS OF THE CYTOSTATIC EFFECT.**

K.Kirilenko, O. Rybalkina

Scientific supervisor: PhD O.Yu. Rybalkina

Goldberg Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine

Russia, Tomsk, Lenin Ave, 3, 634028

E-mail: kirillkirilenkotomsk@gmail.com

Abstract. *This study researches the effect of the black chokeberry fruit extract (Aronia melanocarpa (michx.) Elliot) on the the hematopoietic erythroid lineage under conditions of the cytostatic effect. The study is important today because oncological patients undergoing cytostatic chemotherapy have noticeable suppression of the hematopoietic erythroid lineage, and, as a result, the development of anemic syndrome. Yet there are few ways of correcting the anemic syndrome. The aim of this work is to study the effect of the black chokeberry fruit extract (Aronia melanocarpa (michx.) Elliot) on the the hematopoietic erythroid lineage under conditions of the cytostatic effect. The suppressed model of the hematopoietic erythroid lineage was cytostatic myelosuppression induced by a single [acute] dosing of doxorubicin to healthy mice intraperitoneally at the maximum tolerated dose (6 mg/kg). The experiments were performed on 78 female C57BL/6 mice, the black chokeberry fruit extract (Aronia melanocarpa (michx.) Elliot) was injected into the mice daily per os. at a dose of 5 ml/kg for 14 days, 24 hours after a single [acute] dose of doxorubicin. As expected, the injection of doxorubicin at the maximum tolerated dose leads to the evident suppression of the hematopoietic erythroid lineage. The course introduction of the black chokeberry fruit extract (Aronia melanocarpa (michx.) Elliot) had a stimulating effect on the processes of erythropoiesis under conditions of cytostatic myelosuppression.*

Введение. Цитостатическая химиотерапия является одним из самых эффективных и распространенных средство в борьбе с новообразованиями, но известно, что препараты цитостатического ряда имеют ряд нежелательных эффектов особенно со стороны быстроделющихся тканей. Одним из таких побочных эффектов является угнетение костномозгового кроветворения, в частности, эритропоэза, что приводит к развитию анемического синдрома [1, 2]. Существует небольшое количество способов и средств, снижающих анемический синдром, которые не лишены своих

собственных побочных эффектов или не могут быть широко использованы в лечебной практике. Таким образом, поиск препаратов или средств, способных снижать анемический синдром, возникающий на фоне цитостатической химиотерапии, это актуальная проблема для онкологии, в том числе, для онкофармакологии. Подающим надежды направлением является поиск препаратов на основе природных соединений, снижающих анемический синдром. Перспективным в этом направлении могут быть фенольные соединения, в частности, антоцианы. К антоциансодержащим растениям относятся растений рода *Aronia*. Так, имеются исследования, доказывающие о противоопухолевых действиях аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa (michx.) Elliot*), о способности понижать анемический синдром, возникающий на фоне развития сахарного диабета [3, 4]. Цель исследования – изучить влияние экстракта плодов аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa (michx.) Elliot*) на эритроидный росток кроветворения в условиях цитостатического воздействия.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на 78 мышах-самках линии C57BL/6. В качестве модели угнетения эритроидного ростка кроветворения использовалась цитостатическая миелосупрессия, вызванная однократным внутрибрюшинным введением доксорубина в дозе 6 мг/кг (максимально переносимая доза). Доксорубин – широко используемый в онкологической практике цитостатический препарат антрациклинового ряда. Спиртовой экстракт плодов рябины черноплодной (*Aronia melanocarpa (michx.) Elliot*), предоставленный кафедрой фармакогнозии с курсами ботаники и экологии СибГМУ, вводили мышам ежедневно per os в дозе 5 мл/кг в течение 14 суток, спустя 24 часа после однократного введения доксорубина. Показатели периферической крови (общее количество эритроцитов, гемоглобин, гематокрит, ретикулоциты), костного мозга (общее количество миелокариоцитов, миелограммы) и его клональной активности определяли на 0, 3, 5, 7, 10, 12 и 15 сут после введения цитостатика стандартными гематологическими методами [5]. Статистическая обработка результатов производилась с использованием непараметрических методов Вилкоксона-Манна-Уитни [6].

Результаты. Однократное введение здоровым мышам доксорубина в максимально переносимой дозе (6 мг/кг) одинаково угнетало все ростки гемопоэза. В периферической крови животных наблюдалась ретикулоцитопения, максимальное падение числа ретикулоцитов наблюдалось на 5 сутки эксперимента: их количество снизилось в 3,8 раза относительно показателя группы интактного контроля. Содержание эритроцитов в периферической крови на 3 и 5 сутки эксперимента было достоверно ниже контрольной группы, на 5 сутки эксперимента содержание гемоглобина было также достоверно ниже группы интактного контроля. Уровень гематокрита на протяжении всего эксперимента достоверно не отличался от фоновых значений. Аналогичные результаты выявлены при оценке основных показателей миелограмм и клональной активности в костном мозге. При изучении колониеобразующей способности кроветворных клеток-предшественников эритропоэза в костном мозге у мышей, получавших доксорубин, выявлено достоверное снижение содержания КлОЕ-Э и КОЕ-Э на 3, 5, 7 сут после инъекции цитостатика, с последующим их восстановлением на 15 сут.

Курсовое введение экстракта плодов аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa (michx.) Elliot*) оказало стимулирующее действие на процесс эритропоэза у мышей в условиях цитостатического угнетения эритроидного ростка кроветворения. Так, на 3, 10 сутки эксперимента включение экстракта плодов аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa (michx.) Elliot*) в схему химиотерапии приводило к достоверному росту содержания общего количества эритроцитов, содержания гемоглобина, уровня

гематокрита в периферической крови животных относительно группы монокимиотерапии. На 3-12 сутки эксперимента количество ретикулоцитов у животных, получавших экстракт, было достоверно выше значений относительно таковых показателей в группе мышей, получавших только доксорубин (монокимиотерапия). Анализ миелограмм показал достоверное увеличение содержания эритроидных клеток в костном мозге в группе мышей, получавших растительный препарат, на 3 (в 3,4 раза), 5 (в 2,2 раза), 7 (в 1,8 раза), 10 (1,6 раза), 12 (1,3 раза) сутки эксперимента относительно группы монокимиотерапии. Анализ колониеобразующей способности костного мозга мышей после применения экстракта плодов аронии черноплодной (*Arónia melanocárpa (Michx.) Elliot*) на фоне однократного цитостатического воздействия на 5, 12 и 15 сут после инъекции цитостатика. Так, количество КлОЕ-Э на 12 и 15 сут эксперимента достоверно повысилось в 1,4 и 2,0 раза соответственно относительно этого показателя в группе монокимиотерапии. На 5 сут наблюдалось увеличение числа КОЕ-Э в 3,0 раза.

Заключение. Курсовое применение экстракта плодов аронии черноплодной (*Arónia melanocárpa (Michx.) Elliot*) в дозе 5 мл/кг на фоне доксорубин-индуцированного угнетения эритроидного роста кроветворения препятствует развитию анемического синдрома за счет мобилизации эритроидных клеток-предшественников костного мозга, что приводит к увеличению выхода клеток эритроидного роста кроветворения из костного мозга в периферическую кровь животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Королева И.А., Копп М.В., Шаплыгин Л.В. Профилактика и коррекция нейтропении и анемии, вызванных противоопухолевой химиотерапией // Клиническая онкогематология. – 2012. - №3. - С. 246-254.
2. Ludwig H., Van Belle S., Barrett-Lee P., Birgegård G., Bokemeyer C., Gascón P., Kosmidis P., Krzakowski M., Nortier J., Olmi P., Schneider M., Schrijvers D. (2004). The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. *Eur J Cancer*, no. 15, pp. 2293-2306.
3. Ciocoiu M., Miron A., Bădescu M. (2008). New polyphenolic extracts for oxidative stress treatment in experimental diabetes. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.*, no. 112, pp. 757-763.
4. Thani N.A., Keshavarz S., Lwaleed B.A., Cooper A.J., Rooprai H.K. (2014). Cytotoxicity of gemcitabine enhanced by polyphenolics from *Aronia melanocarpa* in pancreatic cancer cell line AsPC-1. *J Clin Pathol.*, no. 67, pp. 949-954.
5. Новицкий В.В. Методические разработки практических занятий по курсу гематологии для студентов медико-биологического факультета с элементами УИРС. – Томск, 1986. – 125 с.
6. Гмурман В.Е. Теория вероятностей и математическая статистика: учеб. Пособие для вузов. – М: Высш. шк., 2002. – 479 с.

**РОСТ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА В
ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ**

К.М. Климова

Научный руководитель: к.б.н. Ю.А. Франк

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: ksenia.m.klimova@gmail.com

**GROWTH OF SULFATE-REDUCING BACTERIA IN THE HIGH CONCENTRATIONS OF IRON
IONS**

K.M. Klimova

Scientific Supervisor: Y.A. Frank, PhD

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: ksenia.m.klimova@gmail.com

***Abstract.** Sulphate-reducing bacteria (SRB) are anaerobic microorganisms that use sulphate as a terminal electron acceptor in, for example, the degradation of organic compounds. They are ubiquitous in anoxic habitats, where they have an important role in both the sulphur and carbon cycles. SRB can cause a serious problem for industries, such as the offshore oil industry, because of the production of sulphide, which is highly reactive, corrosive and toxic. However, these organisms can also be beneficial by removing sulphate and heavy metals from waste streams. Although SRB have been studied for more than a century, it is only with the recent emergence of new molecular biological and genomic techniques that we have begun to obtain detailed information on their way of life.*

Введение. Известно, что геологические породы и минеральные отложения, созданные гидротермальной циркуляцией, охватывают микробные сообщества с экологическими и функциональными характеристиками, соответствующими химии их основного субстрата [1]. Кроме того, было показано, что микроорганизмы взаимодействуют со своей породой или минеральной средой путем растворения и осаждения минералов.

Исследование физиологического и филогенетического разнообразия прокариот глубоководных экосистем с использованием культивирования и молекулярных подходов показало их важную экологическую роль в биохимических циклах углерода (C), азота (N), серы (S) и железа (Fe) [2]. Для микроорганизмов железо является потенциальным субстратом как для запасания энергии (восстановление железа), так и для дыхания (окисление железа). Кроме того, Fe²⁺ используется как кофактор во многих ферментах [3]. Сульфидное осаждение металлов из гидрометаллургических растворов представляет значительный промышленный интерес, поскольку оно может обеспечить селективность в разделении металлов и вторичное использование железа.

Целью данной работы является определение устойчивости к ионам железа (Fe²⁺) для штаммов сульфатредуцирующих бактерий, выделенных из геотермально нагреваемых вод в Томской области и Забайкальском крае. Представители типов Firmicutes (штамм *Desulfotomaculum* Bu1-1) Nitrospirae (штамм *Thermodesulfovibrio* V2) являются термофильными бактериями с оптимумом для роста 55-65 °C. В

качестве референсного штамма, не связанного с геотермальными местообитаниями, был выбран штамм *Desulfovibrio* A2 (Deltaproteobacteria), растущий при 28 °С.

Материалы и методы исследования. Штаммы культивировались на стандартной среде Видделя (Widdel, Bak, 1992) при нейтральном pH=7.0-7.2. Среда содержала (на литр) 1 г NaCl, 0.4 г MgCl₂ 6H₂O, 0.15 г CaCl₂ 2H₂O, 4.0 г Na₂SO₄, 0.25 г NH₄Cl, 0.2 г KН₂PO₄, 0.5 г KCl, 1 мл микроэлементного раствора, 1 мл раствора витамина, и 1 мл раствора селенит-вольфрамата. В среду перед посевом добавляли 0,16 мл лактата на 100 мл среды (для штаммов *Thermodesulfovibrio* V2 и *Desulfovibrio* A2) или 0.5 мл изобутератана 100 мл среды (для штамма *Desulfotomaculum* Bu1-1). В качестве источника ионов Fe²⁺ к среде добавляли водный раствор FeSO₄×7H₂O, постепенно увеличивая концентрацию в каждом пассаже. В качестве дополнительного источника ионов вместе с инокулятом добавляли железную скрепку. Рост штамма *Thermodesulfovibrio* V2 происходил при температуре 65С°, *Desulfotomaculum* Bu1-1 при 50С°, *Desulfovibrio* A2 при 28С°. Все культуры были помещены в термостаты и росли в полной темноте. Подсчет клеток проводили в конце логарифмической фазы роста с использованием фазово-контрастного микроскопа. Эксперимент выполняли в трех параллельных повторностях.

Результаты. Все исследованные штаммы сульфатредуцирующих бактерий показали высокую устойчивость к ионам данного металла. Рост штамма *Thermodesulfovibrio* V2 зафиксирован при концентрации 2.5 г/л (Рисунок 1, А), *Desulfotomaculum* Bu1-1 при 2.0 г/л (Рисунок 1, Б). *Desulfovibrio* A2 способен к росту при содержании железа 5.0 г/л, хотя численность клеток снижалась уже при его концентрации 3.0 г/л (Рисунок 1, В).

Ранее было показано, что *Desulfovibriosp.* A2 способен переносить до 800 мг/л меди в жидких средах, используя лактат в качестве донора электронов и источника углерода, что превышает предельные допустимые концентрации данного металла для других бактериальных штаммов в 10-16 раз [4]. Исследование генома устойчивых к железу микроорганизмов предполагает как минимум один ген, участвующий в гомеостазе меди и железа: Cu-Fe протеин (DA2_2478), связанный с белком толерантности к железу штамма *Desulfovibrio aminophilus* DSM12254 [5]. Так же генетические детерминанты для Fe-резистентности могут быть связаны с плазмидами. Кроме того, есть еще один механизм устойчивости к железу – клетки переносят высокие начальные концентрации ионов металла в связи с постепенным осаждением сероводородом в нерастворимые формы.

Заключение. Штаммы *Desulfotomaculum* Bu1-1 и *Thermodesulfovibrio* V2 также показали высокую толерантность к ионам двухвалентного железа. Механизмы их резистентности к могут быть схожи с механизмами, показанными в работах [4] и [5]. В дальнейшем планируются исследования геномов данных микроорганизмов и поиск генов, отвечающих за устойчивость к ионам Fe²⁺.

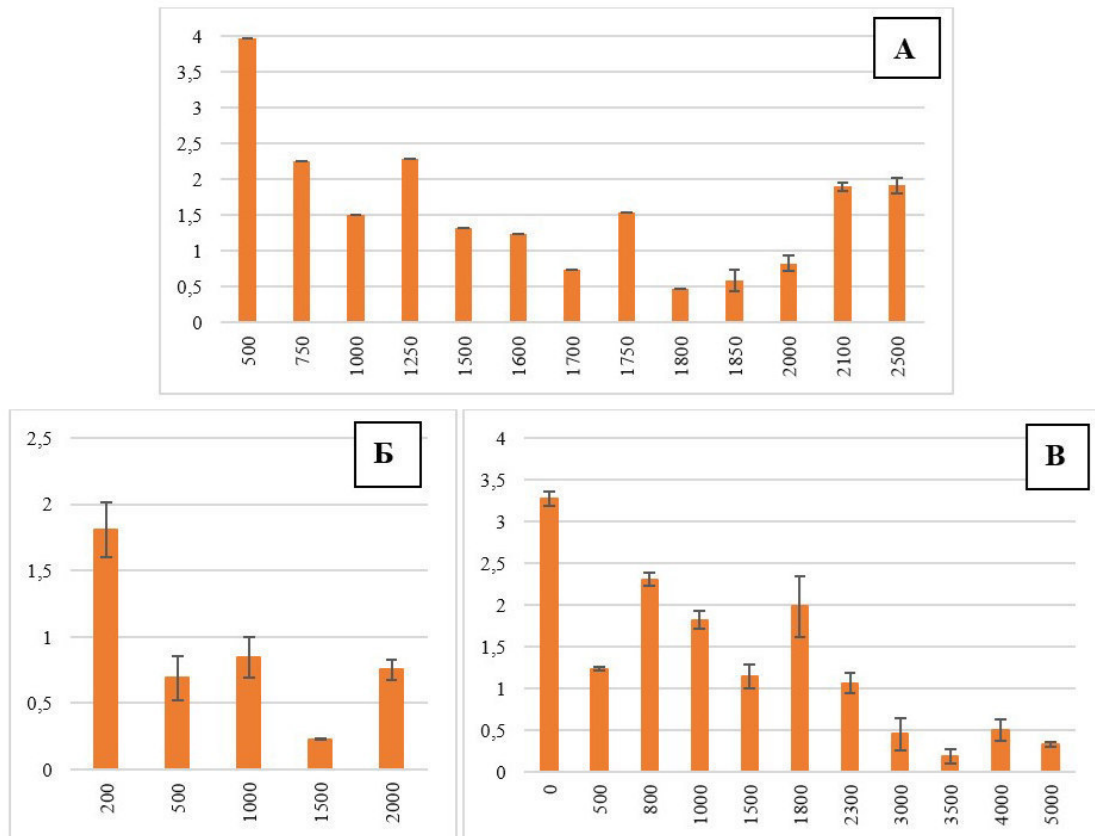


Рис. 1. Диаграммы роста штаммов при повышении концентрации железа. А – динамика роста штамма V2. Б – динамика роста штамма VuI-1. В – динамика роста штамма A2. Вертикальная и горизонтальная оси - количество клеток во флаконе (клеток $\times 10^6/\text{мл}$) и концентрация железа (Fe^{2+}) в среде Видделя ($\text{мг}/\text{дм}^3$)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wheat, C. G., Mottl, M. J., Fisher, A. T., Kadko, D., Davis, E., Baker, E. (2004). Heat flow through a basaltic outcrop on a sedimented young ridge flank. *Geochem. Geophys. Geosyst.*, no. 5, pp. 118-136.
2. Yucel, M., Gartman, A., Chan, C. S., George, W., Luther, I. (2011). Hydrothermal vents as a kinetically stable source of iron-sulphide-bearing nanoparticles to the ocean. *Nat. Geosci.*, no. 4, pp. 367-371.
3. Emerson, D. (2016). The irony of iron – biogenic iron oxides as an iron source to the Ocean. *Front. Microbiology*, no. 6, pp. 321-336.
4. Mancini, S., Abicht, H., Karnachuk, O., Solioz, M. (2011). Genome Sequence of *Desulfovibrio* sp. A2, a Highly Copper Resistant, Sulfate-Reducing Bacterium Isolated from Effluents of a Zinc Smelter at the Urals. *Journal of bacteriology*, no. 193, pp. 6793-6794.
5. Karnachuk, O. V., Sasaki, K., Gerasimchuk, A. L., Sukhanova, O., Ivashenko, D. A., Kaksonen, A. H., Puhakka, J. A., Tuovinen, O. H. (2008). Precipitation of Cu-sulfides by copper-tolerant *Desulfovibrio* isolates. *Geomicrobiol. Journal*, no. 25, pp. 219-227.

THE NEW APPROACH TO THE TREATMENT OF POSTOPERATIVE VENTRAL HERNIAS

A.M. Kodirova, I.O. Kalyakanova, Z.S. Kaitova

Scientific advisor: Professor, A.V. Protasov, MD, PhD

RUDN University, Russia, Moscow, Miklukho-Maklaya str. 8, 117198

E-mail: k.aziza96@bk.ru

НОВЫЙ МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ВЕНТРАЛЬНЫХ ГРЫЖ

A.M. Кодирова, И.О. Каляканова, З.С. Каитова

Научный руководитель: д.м.н., профессор А.В. Протасов

РУДН, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая 8, 117198

E-mail: k.aziza96@bk.ru

***Аннотация.** После лапаротомий самым частым осложнением в отдаленный период являются послеоперационные вентральные грыжи. Нами был проведен сравнительный анализ лечения 66 пациентов с послеоперационными вентральными грыжами в период с января 2010 по декабрь 2016 года. Для закрытия грыжевого дефекта был выбран современный самофиксирующийся имплантат Progrid™.*

Introduction. The biomaterials for prosthetics for the first time began to be used in hernia. Of particular interest are studies on the use of modern materials for hernioplasty such as polypropylene (PPL) and polytetrafluoroethylene (PTFE) [1]. Although the use of mesh implants also reduced the risk of recurrence of hernias, however, every third patient reverts for surgical care [2]. It was proved that through the cellular structure the connective tissue sprouts faster, forming the framework of the anterior abdominal wall. The physical properties of the prosthesis (size, shape of the pores, specific gravity, density and structure) and the characteristics of the human body affect the duration and quality of the ingrowth of the prosthesis in surrounding tissues [3, 4]. The formed carcass, consisting of an implant and connective tissue, should provide strength and elasticity of the anterior abdominal wall. The most important is biocompatibility, that is, the implant should not cause allergic reactions, sensitization, inflammation and rejection [5-7]. Studies of implants from PTFE and PPL showed that a connective tissue capsule forms around the implants, creating a coarse scar with an incomplete implantation of the implant. The processes of material degradation cause the loss of physical properties of the prosthesis. Reduction of the prosthesis occurs up to 50% of the original size, which can lead to recurrence of hernia [6, 8, 9, 10]. Later, composite mesh implants appeared, where two-component materials with a hydrolyzing component and a reduced amount of polypropylene, Teflon or titanium content were used [11]. Composite implants also include self-locking mesh prostheses. The mesh prosthesis is fixed to the tissues with the help of glue coatings or with the help of micro-hooks that dissolve within a certain time [12]. Good results were obtained with the use of Covidien Progrid implant [4, 13, 14, 15]. Thus, the purpose of our research was to determine the effectiveness of the self-locking Progrid™ implant.

Materials and methods. The study included 66 patients operated on for postoperative ventral hernia. The first group of patients was made up to 60 years of age, the second group - older than 60 years (see Table 1). In each group, patients were operated with a Progrid™ self-locking implant of the standard form (subgroup B) and a

modeled implant (subgroup A). The implant model was developed by Professor Protasov A.V. (2013). This modification allows you to translate the direction of the action of tensile forces from the transverse to longitudinal, thus strengthening the strength characteristics of the implant.

Table 1

Patient distribution by groups

	Group I	Group II	Total
Modeled implant	14	17	31
Standard implant	18	17	35
Total	32	34	66

According to the classification of Chevrel J.P. and Rath A.M. from 1999, the study included patients $S_m W_{1-4} R_{0-2}$, where "S_m" means median localization, patients with mixed and lateral defect localization were excluded. The width of the hernia defect - "W" and the number of relapses - "R" did not matter when selecting patients. The width of the hernia gates varied from 4 to 25 cm. The number of patients with the sizes of hernial gates W₃ (10-15 cm) - 23 people (34.8%). In terms of the number of relapses, patients both previously unoperated and postoperative surgical interventions for postoperative hernia were met. Recurrent hernias were diagnosed in 21 (31.8%), in the remaining cases, hernioplasty was performed for the first time. The period of patients' recourse from the time of hernia defect appearance ranged from 6 months to 10 years. During the first year, only 23 people applied for help (34.8%), which once again confirms the medical illiteracy of patients and careless treatment of their health. The volume of examinations in the preoperative period corresponded to all the requirements of training in view of chronic diseases. In the postoperative period, all patients received analgesia according to the standard scheme. If necessary, antibiotic therapy and prevention of thromboembolic complications were prescribed. The tactic of early activation of patients with the wearing of a bandage was used.

Results. The duration of surgery depends on the size of the hernia defect, and does not depend on the age of the patients being operated. With a hernial defect up to 10 cm, the duration of the operative intervention was 69.4 ± 6.1 minutes. In patients with a hernial portal more than 10 cm the operation time increased to 96.1 ± 11.4 minutes. Suppuration of a postoperative wound in a patient with a history of secondary wound healing after the primary operation was revealed, despite the antibiotic therapy started and the daily wound dressings. Complications associated with the formation of gray and suppurative hematomas were also conservatively resolved, no additional surgery was required. In the late postoperative period, the observation period for patients was 2 to 8 years. Relapse of the disease was recorded in 6 (9.1%) patients. Relapse with the simulated implant occurred only in one patient - group I. The reason for the relapse is the failure of clinical recommendations after the operation. In the remaining 5 (7.5%) cases, reliable data on the cause of relapse was not obtained. Despite the scope of the surveys, it was not possible to completely avoid the complications of chronic diseases. One patient suffered from deep vein thrombosis.

Conclusions. It is necessary to conduct sanitation and educational work among the population at the level of the primary polyclinic link to prevent recurrence of postoperative ventral hernias. The simulated implant shows the

best results of treatment of ventral hernias. It is possible to introduce this method into practical surgery in patients with postoperative ventral hernias of the median localization.

REFERENCES

1. Protasov, A. V., Bogdanov, D. Yu., Magomadov, R. Kh. Practical aspects of modern hernioplasty. M: RUSAKI, 2011, pp. 6-31.
2. Poulouse, B. K., Shelton, J., Phillips, S. et al. (2012). Epidemiology and cost of ventral hernia repair: making the case for hernia research. *Hernia*, no. 2, pp. 179-183.
3. Procter, L., Falco, E. E., Fisher, J. P., Roth, J. S. (2009). *Bioengineering research of chronic wounds*. First ed. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp. 425-447.
4. Wang, Y., Zhang, X. (2016). Short-term results of open inguinal hernia repair with self-gripping ParietexProGrip mesh in China: A retrospective study of 90 cases. *Asian J Surg*, Vol. 39, pp. 218-224.
5. Kalmin, O. V., Nikolsky, V. I., Fedorova, M. G. et al. (2012). Morphological changes of tissues in the operation area during implantation of xenopericardium and polypropylene mesh at different times after surgical intervention. *Saratov Journal of Medical Scientific Research*, no. 4, pp. 1008-1012.
6. Sovtsov S. A., Pryakhin A. N., Shestopalova I. S. The main principles and materials for prosthetics of external abdominal hernia. Chelyabinsk: a study guide, 2009, pp. 12-25.
7. Bilsel, Y., Abci, I. (2012). The search for ideal hernia repair, mesh materials and types. *Int J Surg*, no. 10, pp. 317-321.
8. Bachman, S., Ramshaw, B. (2008). Prosthetic material in ventral hernia repair: how do I choose? *Surgery Clinic*, Vol. 88, pp. 101-112.
9. Saberski, E. R., Orenstein, S. B., Novitsky, Y. W. (2011). Anisotropic evaluation of synthetic surgical meshes. *Hernia*, Vol.15, pp. 47-52.
10. Tobias, A. M., Low, D. W. (2009). The use of subfascialvicryl mesh buttress to aid in the closure of massive ventral hernias following damage-control laparotomy. *Plast Reconstr Surg*, Vol. 112, no. 3, pp. 766.
11. Brown, C. N., Finch, J. G. (2010). Which mesh for hernia repair? *Ann R Coll Surg Engl*, Vol. 92, pp. 272-278.
12. Vorst, A. L., Kaoutzanis, C., Carbonell, A. M., Franz, M. G. (2015). Evolution and advances in laparoscopic ventral and incisional hernia repair. *World J Gastrointest Surg*, no. 11, pp. 293-305.
13. Kalyakanova, I. O., Protasov, A. V., Kaitova, Z. S. (2017). A new way of modeling the implant ProGripTM in postoperative ventral hernias and hernias of the white abdominal line. *Morphology*, no. 3, pp. 73-74.
14. Hopson, S. B., Miller, L. E. (2015). Open ventral hernia repair using ProGripTM self-gripping mesh. *Int J Surg*, Vol. 23, pp. 137-140.
15. Verhelst, J., Goede, B., Kleinrensink, G. J. et al. (2015). Open incisional hernia repair with a self-gripping retromuscular Parietex mesh: A retrospective cohort study. *Int J Surg*, Vol. 13, pp. 184-188.

**ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ
ПОЛИТЕТРАФТОРЭТИЛЕНА В КАЧЕСТВЕ РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ ПРИ ДЕФЕКТАХ
СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ**

А.Д. Коняева, С.А.Крикова

Научный руководитель: профессор, д.м.н. Е.Ю. Варакута

Сибирский Государственный медицинский университет,

Россия, г. Томск, Московский тракт 2а

E-mail: Asyakonya95@gmail.com

**POSSIBILITY OF USING POLYMERIC MATRICES BASED ON POLYTETRAFLUOROETHYLENE
AS A COATING AT WOUND DEFECTS OF MUCOUS MEMBRANE OF THE ORAL CAVITY**

A.D.Koniaeva, S.A.Krikova

Scientific Supervisor: Prof., Dr.M.Yu. E.Y Varakuta

Siberian State medical university, Russia, Tomsk, Moskovsky tr. 2a, 634050

E-mail: Asyakonya95@gmail.com

***Abstract.** The problem of managing wound defects of the oral mucosa is relevant at the present time. Often, healing of extensive wounds occurs through secondary tension with the formation of scar tissue, which affects subsequent stomatological treatment adversely. The solution to this problem is using of various wound coatings to reduce the traumatic, mechanical and microbial effects on the defect. The purpose of this research is observing the morphological changes in the wound defect of the oral mucosa using a protective coating of polytetrafluoroethylene in time.*

Введение. Проблема лечения больных с постоперационными дефектами слизистой оболочки полости рта является актуальной в настоящее время. Особенности строения слизистой оболочки полости рта обуславливают проведение обширных оперативных вмешательств даже при небольших поражениях, в результате чего иссекается значительный объем мягких тканей. Использование стандартных методик-наложение первичных швов, закрытия дефекта йодоформной турундой обуславливают такие негативные постоперационные проблемы, как нарушение архитектоники тканей, неравномерная регенерация тканей, образование рубцовых дефектов.

Существует ряд методик ведения ран слизистой оболочки полости рта, при которых используются материалы аллогенного, аутогенного и ксеногенного происхождения, а также синтетические барьерные мембраны для закрытия раневых поверхностей. Представителем группы регенеративных медицинских изделий является мембрана GORE-TEX, которая считается «золотым стандартом» в хирургической стоматологии. В качестве материала для мембран, таких как GORE-TEX, используют полимер тетрафторэтилена. Нетканые материалы из политетрафторэтилена (фторопласт) обладают свойствами биосовместимости и биodeградируемости.

Цель исследования: проследить морфологические изменения раневого дефекта СОПР при использовании защитного покрытия из политетрафторэтилена(ПТФЭ), разработанного в лаборатории гибридных биоматериалов НИИ ТПУ.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлась слизистая оболочка щеки крыс-самцов линии Вистар. Проводилась серия опытов на на 45-ти животных, которые были разделены на 3 группы:

1 группа: (контрольная) – интактные белые крысы-самцы (n=15)

2 группа: (экспериментальная) – белые крысы-самцы, которым под внутримышечным наркозом Золетилом производили иссечение лоскута слизистой оболочки щеки размером 7 на 4 мм. Далее дефект оставлялся открытым для заживления вторичным натяжением (традиционная методика). (n=15)

3 группа: (экспериментальная) белые крысы-самцы, внутримышечным наркозом Золетилом производили иссечение лоскута слизистой оболочки щеки размером 7 на 4 мм. Далее стерильным пинцетом из упаковки извлекалась стерильная полимерная матрица из политетрафторэтилена без напыления, которая укладывается на дефект так, чтобы она перекрывала его на 2мм. Матрица фиксировалась шовным материалом Vicryl 5-0 на атравматичной игле узловыми швами.(n=15)

Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 3, 7, 12 сутки исследования. Изъятие материала производится после эвтаназии животных посредством углекислого газа. Во время операции выполнялся забор полнослойного соединительнотканного ауто трансплантата щеки (в области ранее сформированного дефекта) с частичным захватом по краям раны здоровой соединительной ткани. Для оценки морфологических изменений аутопсийного экспериментального материала использовался комплекс следующих методов:

Препарат слизистой оболочки щеки фиксировался в 10% нейтральном формалине с последующей проводкой в спиртах восходящей концентрации и ксилоле и заливкой в парафин. С помощью ротационного микротомы изготавливались срезы толщиной 5 мкм. После депарафинизации производилась окраска срезов гематоксилином и эозином. Далее проводилась морфологический анализ раневого дефекта [1-5].

Результаты. На 3-и сутки исследования макроскопически у крыс 2-ой группы наблюдался раневой дефект размером 7х3 мм, покрытый рыхлым желтоватым налетом, имелся отек окружающих мягких тканей, у крыс 3-ей группы под покрытием наблюдался раневой дефект размером 6х3мм, в центре которого имелся плотный желтоватый налет. Микроскопически у крыс 2-ой группы наблюдалась обширный некроз, лимфогистиоцитарная инфильтрация(ЛГЦИ) в области дефекта в виде демаркационного вала, полнокровие сосудов и отек соединительной ткани по периферии., признаков развития грануляционной и рыхлой волокнистой соединительной ткани не наблюдалось. У крыс 3-ей группы определялась очаги некроза, ЛГЦИ, местами наблюдались островки грануляционной ткани(ГТ), в зоне перифокального воспаления- полнокровие и стаз сосудов, отек соединительной ткани. В обеих группах активно проходила первая фаза раневого процесса-травматического воспаления с преобладанием компонентов повреждения тканей.

Макроскопически на 7-е сутки у крыс 2-ой группы наблюдался раневой дефект размером 4*2 мм с желтоватым налетом по центру, отмечалось недостаточное восстановление объема мягких тканей. У крыс третьей группы имелся дефект размером 2х2 мм, без налета, восстановление проходило с достаточным образованием мягких тканей. Микроскопически во 2-ой группе отмечалось уменьшение ЛГЦИ, небольшие островки некроза, активное развитие ГТ, небольшие пучки коллагеновых волокон, краевая эпителизация раны. В 3-ей группе-полное исчезновение очагов некроза, интенсивное

уменьшение ЛГЦИ, активное образование ГТ и рыхлой волокнистой соединительной тканей, наблюдалось восстановление эпителиального пласта от периферии к центру.

На 12-е сутки у крыс 2-ой группы наблюдалась полное заживление раневого дефекта с образованием рубца размером 4*2мм, у крыс 3-ей группы восстановление произошло с образованием достаточного объема мягких тканей без рубцевания. Гистологически во 2-ой группе наблюдалось отсутствие очагов некроза и незначительная ЛГЦИ, имелись островки ГТ, зона дефекта заполнена, как рыхлой, так и плотной волокнистой соединительной тканью, отмечалась неполная эпителизация раны. В 3-ей группе наблюдалось отсутствие ЛГЦИ, полная эпителизация раны, место дефекта полностью заполнено молодой рыхлой волокнистой соединительной тканью.

Заключение. Таким образом, полимерная матрица из политетрафторэтилена, фиксированная по периферии раны узловыми швами, изолирует и защищает ее от внешних воздействий, создавая благоприятные условия для процесса заживления. Использование защитного покрытия из политетрафторэтилена для ведения постоперационных ран СОПР благоприятно влияет на процессы регенерации дефекта, индуцируя тканеобразование и снижая риск развития рубцовых деформаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шинкевич Д.С. Особенности заживления послеоперационных ран мягких тканей лица в области преддверия та, изолированных силиконовыми мембранами, диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: 14.00.21 / Шинкевич Дмитрий Сергеевич; [Место защиты: ГОУВПО "Московский государственный медико-стоматологический университет"].- Москва, 2008.- 125 с.: ил
2. Мочалова Д.А. Экспериментально-клиническое изучение особенностей регенерации слизистой оболочки полости рта с использованием полимерной мембраны, диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, Нижний Новгород – 2015
3. Д.А. Рябова, Н.Ю. Орлинская, С.Н. Цыбусов, Н.Е. Хомутичкина, Р.Д. Лапшин, Е.А. Дурново, //СТМ-, 2016, том 8, номер 1, стр. 55-63
4. Bax D. V. et al. Surface plasma modification and tropoelastin coating of a polyurethane co-polymer for enhanced cell attachment and reduced thrombogenicity //Biomaterials. – 2014. – Т. 35. – №. 25. – С. 6797-6809.
5. A. D. Badaraev, A. L. Nemoikina, E. N. Bolbasov, and S. I. Tverdokhlebov, "PLLA scaffold modification using magnetron sputtering of the copper target to provide antibacterial properties," Resour. Technol., vol. 3, no. 2, pp. 204–211, Jun. 2017.

**РАДИОЧАСТОТНАЯ АБЛЯЦИЯ ВЕН КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ВАРИКОЗНОЙ
БОЛЕЗНИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

А.Л. Кулакова

Научный руководитель: профессор, д.м.н. А.В. Протасов
Российский университет дружбы народов, Медицинский Институт
Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8, 117198
E-mail: Sable@ro.ru

**RADIOFREQUENCY ABLATION AS EFFECTIVE TREATMENT FOR VARICOSE VEINS OF
LOWER LIMBS**

A.L. Kulakova

Scientific supervisor: Professor, MD, A. V. Protasov
Peoples' Friendship University of Russia, Medical Institute
117198, Moscow, Miklycho-Maklaya Street, 8, Russian Federation
E-mail: Sable@ro.ru

Abstract. Radiofrequency ablation (RFA) is the modern endovenous thermal method of treatment for varicose veins (VV) of the lower limbs which is characterized by high selective influence on pathologically changed vein. Intraoperative duplex sonography (DS) as an integral part of operation provides the precision of RFA treatment. The above-stated endovenous method is low-invasive and is carried out under tumescent anesthesia. In comparison with phlebectomy complications are rare. 75 patients, both sexes, 60% (n=45) women, 40% (n=30) men participated in this research. In preoperative period all patients underwent DS. Visual analog scale, questionnaires of quality of life and sufficiency of treatment were used to assess the effectiveness of RFA and proved supreme results in treatment of VV of the lower limbs. RFA can be recommended as alternative to phlebectomy.

Актуальность. Варикозной болезнью (ВБ) нижних конечностей, которая характеризуется первичной варикозной трансформацией поверхностных вен, страдает свыше четверти населения России и развитых стран. Осложнением ВБ является развитие хронической венозной недостаточности, сопровождающейся появлением отеков, кожных изменений, трофических язв нижних конечностей, инвалидизацией больных [1,2].

На современном этапе развития технологий стало возможным проведение эндовазальных тепловых методов лечения ВБ, таких как радиочастотная абляция (РЧА) вен, с использованием радиоволновой энергии, эндовазальная лазерная абляция вен (ЭВЛА), с использованием коротковолновых и длинноволновых лазеров. Вышеуказанные методы лечения малотравматичны, эффективны, способствуют ранней активизации больных в послеоперационном периоде, являются альтернативой склеротерапии (СТ) и флебэктомии (ФЭ) [3].

Цель работы. Исследовать эффективность применения РЧА при лечении больных ВБ, подобрать оптимальное количество циклов воздействия на различные участки патологически измененной вены.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 75 человек, обоих полов, 45 женщин и 30

мужчин, возраст больных от 22 до 83 лет. Всем больным в предоперационном периоде проведено УЗДГ-исследование вен нижних конечностей. Стадия ВБ определялась с использованием международной классификации CEAP (1994г.) (Таблица 1). Наиболее значимым для определения стадии заболевания является клинический компонент классификации (С-компонент). Больные со стадией С1 не вошли в исследование, так как на вышеуказанном этапе хирургическое лечение не показано, рекомендована консервативная терапия (флеботоники, топические препараты, компрессионный трикотаж, лечебная физкультура).

Таблица 1

Распределение больных по С-компоненту классификации CEAP

Клиническая стадия заболевания	Количество больных (n)	Абсолютное число больных (%)
C2	61	81.4
C3	6	8
C4	6	8
C5	1	1.3
C6	1	1.3
Всего:	75	100

Методика проведения РЧА. По методу Сельдингера в вену вводят проводник. Радиочастотный катетер Closure Fast (VNUS Medical Technologies, Сан-Хосе, Калифорния) продвигают под интраоперационным ультразвуковым контролем в просвет вены до уровня сафено-феморального соустья, от которого необходимо отступить от 10 до 20 мм, дистальнее места впадения v. epigastrica superficialis [4,5]. Для защиты окружающих тканей от теплового воздействия радиоволны производят тумесцентную (паравазальную) анестезию, происходит сдавление поверхностной вены вокруг введенного электрода для повышения эффективности лечения. Рабочая температура аппарата VNUS Closure Fast (VNUS Medical Technologies, Сан-Хосе, Калифорния) составляет 120 градусов Цельсия.

После проведения цикла лечения (20 секунд), аппарат подает обратный звуковой сигнал, что свидетельствует о завершении цикла. Согласно стандартному протоколу операции на прилежащий к сафено-феморальному соустью сегмент вены оказывают воздействие в два цикла, на остальные 7-сантиметровые участки вены - один. Радиоволна приводит к деструкции эндотелия, денатурации коллагеновых волокон, истончению стенки вены [6].

Больные осмотрены в раннем и позднем послеоперационном периоде, всем больным проведено контрольное УЗДГ на первые, седьмые сутки после операции, через полгода, год после операции.

Результаты. Основными осложнениями РЧА являются: аллергические реакции, ожог кожи, парестезия, поверхностный тромбофлебит (ПФ), возникновение гематом. К осложнениям ФЭ относятся: парестезия, ПФ, появление гематом (Таблица 2).

Таблица 2

Осложнения РЧА и ФЭ при лечении ВБ.

Вид осложнения	РЧА (%)	ФЭ (%)
Аллергия	1	0
Ожог кожи	1	0
Парестезия	3	20
ПФ	4	7
Гематома	10	35

По результатам лечения РЧА значительно превосходит ФЭ в отношении появления парестезий, гематом и умеренно в отношении ПФ. Рецидив заболевания после применения РЧА составляет 5 %, ФЭ- 15 %. У 20 % больных с диаметром большой подкожной вены (БПВ) свыше 10 мм (n=15), проведено три цикла лечения. При ФЭ, в связи с отсутствием тумесцентной анестезии не возникло аллергических реакций, ожог кожи при ФЭ исключен. Проведение РЧА технически невозможно при повышенной извитости вены, при диаметре стенки вены свыше 12 мм.

Выводы. РЧА превосходит ФЭ по результатам лечения. Местная анестезия является методом выбора для больных с ВБ, ее проведение при РЧА обеспечивает раннюю активизацию больных после операции. Интраоперационный УЗДГ-контроль во время РЧА обеспечивает прецизионность вмешательства, что уменьшает риск возникновения осложнений. При наличии противопоказаний к РЧА, невозможности ее проведения, применяют ФЭ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McBride K. D. (2011). Changing to endovenous treatment for varicose veins: how much more evidence is needed? *Surgeon*. v. 9, no 3,-pp. 150–159.
2. Onida S., Lane T. R., Davies A. H. (2013). Varicose veins and their management. *Vascular Surgery*. v. 31, no 5,-pp. 211–217.
3. Morrison N., Gibson K., McEnroe S., Goldman M., King T., Weiss R., Cher D., Jones A.. (2015). Randomized trial comparing cyanoacrylate embolization and radiofrequency ablation for incompetent great saphenous veins (VeClose). *J Vasc Surg*. v. 61, no 4,-pp. 985–994.
4. Lattimer C.R., Azzam M., Kalodiki E., Shawish E. (2012). Cost and effectiveness of laser with phlebectomies compared with foam sclerotherapy in superficial venous insufficiency. Early results of a randomized controlled trial. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. v.43, no 5,-pp. 594-600.
5. Kayssi A., Pope M., Vucemilo I., Werneck C. (2015). Endovenous radiofrequency ablation for treatment of varicose veins. *Canadian Journal of Surgery*. v.58, no 2,-pp. 85-86.
6. Protasov A.V., Kulakova A.L., Rogachev M.V. The effectiveness of radiofrequency ablation for varicose veins treatment // Современная парадигма научного знания: актуальность и перспективы: Сборник статей IV международной научно-практической конференции. - Москва, 2016.-С. 161-165.

**УЛУЧШЕНИЕ КАЧЕСТВА ПЛАНИРОВАНИЯ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С
КАРДИОУСТРОЙСТВАМИ**

А.Ю. Курзюкова¹

Научный руководитель: PhD, Одложиликова Анна²

¹ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,
620002, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19

²Масариков онкологический институт, Медицинский факультет Масарикова Университета,
65653, Чешская Республика, Брно, ул. Žlutý kopec 7

E-mail: kurzyukovanastya@gmail.com

**IMPROVEMENT OF RADIOTHERAPY PLANNING QUALITY FOR PATIENTS WITH CARDIAC
DEVICES**

A.Y. Kurzyukova¹

Scientific supervisor: PhD, Odlozilikova Anna²

¹FSAEI HE «Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin», 620002, Russia,
Yekaterinburg, Mira St., 19

²Masaryk Memorial Cancer Institute, Faculty of Medicine Masaryk University, 656 53, Czech Republic, Brno, 7
Žlutý kopec Street

E-mail: kurzyukovanastya@gmail.com

***Abstract.** Nowadays radiation therapy poses a threat to cancer patients with cardiac devices on account of malfunctions caused by ionizing radiation. Although, high-quality irradiation planning is required for such patients, it is hindered by artifacts on computed tomography scans. To solve this problem we have tested artifacts deletion method in Masaryk Memorial Cancer Institute. The data obtained from this experiment confirm the need to use the method in medical practice.*

Введение. С каждым годом растет количество онкологических пациентов с имплантированным электронным кардиостимулятором (ИЭКС), которым был назначен курс радиотерапии. Фотонное ионизирующее излучение, используемое при облучении таких пациентов, может стать причиной неисправностей в кардиостимуляторах, и, следовательно, быть опасным для пациентов. В таких случаях необходимо создание качественных планов лучевой терапии для снижения дозы излучения, получаемой кардиоустройствами и электродами. При планировании лучевой терапии планирующий физик работает с гистограммой Доза-Объем (рисунок 1), каждая кривая которой описывает степень облучения выбранной области. По оси абсцисс представлена доза (Гр), получаемая определенным объемом (кардиоустройством или электродом) при облучении. По оси ординат представлена величина облучаемого объема (%), получаемого определенную дозу. Очевидно, что на 100 % объема кардиоустройства или электродов должна приходиться как можно меньшая доза и график должен стремиться к нулю. Данный график позволяет получить планирующая система Eclipse 11.0, разработанная компанией VARIAN.

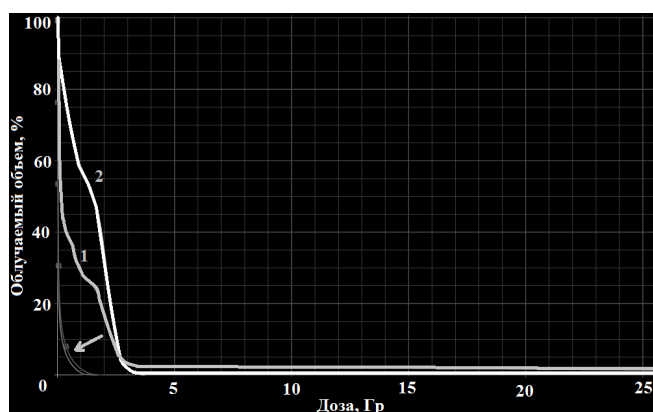


Рис.1. Гистограмма Доза-Объем облучения для кардиостимулятора (1) и электродов (2), построенная в планирующей системе VARIAN Eclipse 11.0

Однако на практике не всегда удается точно произвести расчет доз, получаемых ИЭКС и электродами, так как кардиоимплантаты на снимках компьютерной томографии (КТ) вызывают металлические артефакты, которые вносят погрешности в расчет доз, получаемых устройствами.

Методика исследования. Для решения данной проблемы в Масариковом онкологическом институте был протестирован MDT метод устранения артефактов на планах 9 онкологических пациентов [1]. При планировании радиотерапии использовались такие техники облучения, как 3D-CRT, IMRT, VMAT и SBRT. Планирование проводилось в системе планирования Eclipse 11.0 фирмы VARIAN.

На первом этапе были созданы планы облучения для 9 пациентов без применения MDT метода. Для этого были проконтурированы области опухоли и кардиоустройства. Затем для каждого пациента была выбрана энергия и техника облучения, а также были настроены поля. После чего были рассчитаны дозы, получаемые ИЭКС. На втором этапе эксперимента были созданы новые планы облучения для тех же пациентов с применением MDT метода. Для этого было проведено новое более точное контурирование и скопированы параметры старых планов облучения. После чего были получены новые значения распределения дозы на кардиоустройстве. В результате дозы, полученные до и после применения MDT метода, были сравнены и проанализированы.

Результаты и обсуждение. В таблице 1 представлены значения доз на кардиоустройствах до (D) и после (D_{MDT}) применения MDT метода, а также значения ошибок (σ) измерения доз.

Таблица 1

Дозы, полученные на кардиоустройствах, до и после применения MDT метода

Пациент	D , Гр	D_{MDT} , Гр	σ , %
№ 1	0,79	2,38	3,18
№ 2	0,92	0,95	0,09
№ 3	0,10	0,36	0,58
№ 4	5,56	4,42	1,63
№ 5	0,86	1,02	0,35

№ 6	2,06	2,38	0,80
№ 7	0,14	0,15	0,03
№ 8	1,32	1,35	0,15
№ 9	0,44	0,11	0,66

Анализируя полученные данные, самая большая ошибка в определении дозы, полученной ИЭКС, наблюдалась у пациента №1 и составляла 3,18 % от общей дозы. В большинстве случаев, в планах без обработки КТ изображений методом MDT, наблюдалась тенденция к занижению дозы. Более того у пациента №1 было обнаружено, что до применения MDT метода значение дозы на кардиоустройстве было меньше, чем 2 Гр, в то время как после применения данного метода доза оказалась более 2 Гр. Однако согласно европейскому руководству [2] пациенты, получающие дозу более 2 Гр, относятся к группе среднего риска, а менее 2 Гр – к группе низкого риска. MDT метод позволяет с большей точностью отнести пациента к правильной группе риска и улучшить качество наблюдения за пациентом.

На рисунке 2 можно визуально увидеть работу MDT метода устранения металлических артефактов. Очевидно, что качество КТ-изображений улучшилось за счет уменьшения количества металлических артефактов, при этом область с кардиоустройством соответствует его реальному виду.

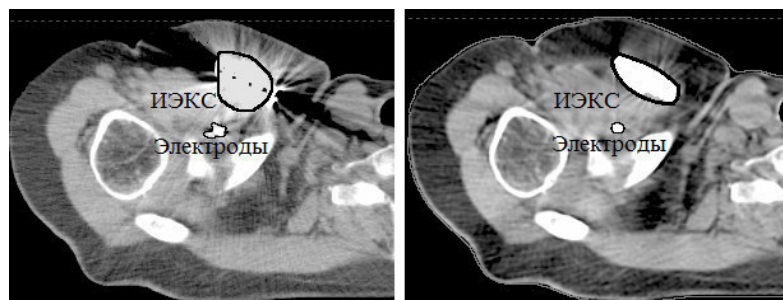


Рис.2. КТ-снимок до (слева) и после (справа) применения MDT метода

Заключение. Тестирование MDT метода показало недооценку дозы, получаемой кардиоустройствами, при этом ошибка в определении дозы на кардиоустройстве может превышать 3 % от общей дозы. Следовательно, точное контурирование почти невозможно без применения данного метода на практике. Более того MDT метод позволяет с большей точностью относить пациентов в правильную группу риска (согласно европейской рекомендации), что является важным, поскольку дальнейшее наблюдение за такими пациентами зависит от этого решения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boas F.E., Fleischmann D. CT artifacts: Causes and reduction techniques // Imaging Med. – 2012. – №4(2). – С. 229–240.
2. Beardmore C. Management of cancer patients receiving radiotherapy with a cardiac implanted electronic device: A clinical guideline // Society of Radiographers. – 2015. – С. 1–17.

**ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ
МАКРОФАГОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЦИСПЛАТИНА**

И.В. Ларионова^{1,2}, Т. Лиу³, В.Б. Рябов³

Научные руководители: профессор, д.б.н. Ю.Г. Кжышковска,
член-корр. РАН, профессор, д.б.н. Н.В. Чердынцева

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

²НИИ онкологии Томского НИМЦ, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

³Институт трансфузионной медицины и иммунологии, Медицинский факультет Маннгейма,
Университет Гейдельберга, Германия, Маннгейм, Теодор-Кутцер-Уфер, 1-3, 68167

E-mail: mitrof@mail.ru

**CHANGE IN THE EXPRESSION OF RECEPTORS OF TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES
UNDER THE CISPLATIN TREATMENT**

I.V. Larionova^{1,2}, T. Liu³, V.B. Riabov³

Scientific supervisor: Prof., Dr. J. Kzhyshkowska, Prof., Dr. N.V. Cherdyntseva.

¹Laboratory of Translational Cellular and Molecular Biomedicine, Tomsk State University,
Russia, Tomsk, Lenin av., 36, 634050

²Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,
Russia, Tomsk, Per. Kooperativny, 5, 634050

³Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg,
Germany, Mannheim, Theodor-Kutzer-Ufer, 1-3, 68167

E-mail: mitrof@mail.ru

Abstract. *In the present study, the analysis of the effect of cisplatin on the expression of the receptors, responsible for the internalization of components of tumor microenvironment, was carried out on the model tumor-associated macrophages (TAM). We performed PCR quantitative analysis of the expression of CD206, CD163, LYVE1, stabilin-1 - the main scavenger receptors expressed on the TAM, and the analysis of the surface expression by confocal microscopy allowed to establish the differences in the effect of cisplatin on model TAM of breast adenocarcinoma and human colorectal carcinoma. It was found that cisplatin has suppressing effect on the scavenging potential of macrophages, except the increasing of the potential for endocytosis of hyaluronic acid in model macrophages of breast tumor, but not of colorectal cancer.*

Введение. Использование химиотерапевтических агентов является наиболее эффективным подходом для лечения основных онкологических нозологий [1]. Для усиления эффективности действия химиотерапевтических препаратов, выявления новых механизмов отсутствия ответа на химиотерапию и механизмов, усиливающих данный эффект, а также для разработки персонифицированных схем терапии необходимо выявление фенотипических и функциональных особенностей опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) в условиях терапии [2, 3].

В данной работе изучено влияние химиотерапевтического препарата цисплатина на макрофагальные рецепторы, отвечающие за интернализацию компонентов опухолевого микроокружения (компонентов внеклеточного матрикса, факторов роста, апоптотических клеток) без индукции воспаления в ОАМ: CD206 (маннозный рецептор макрофагов/маркер M2 макрофагов), CD163 (скавенджер-рецептор макрофагов/маркер M2 макрофагов), LYVE1 (рецептор, отвечающий за эндоцитоз гиалуроновой кислоты) и стабиллин-1 (скавенджер-рецептор M2-макрофагов).

Материалы и методы. В качестве модельной системы для ОАМ была использована система стимуляции первичных моноцитов человека супернатантами опухолевых клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) и Colo206F (карцинома кишечника человека). Цисплатин в концентрации 20 μ M был добавлен в культуру макрофагов после 6 дней культивирования на 3 суток. Экспрессия генов была проанализирована при помощи ПЦР в режиме реального времени на 12 донорах. Для конфокальной микроскопии моноциты от 3 доноров были культивированы в системе ОАМ. На 9 день культивирования были приготовлены препараты цитоспинов. Для иммунофлюоресцентной окраски использовали комбинации антител CD68/CD206, CD68/CD163, CD68/LYVE1 и CD68/стабиллин-1.

Результаты. При помощи ПЦР в режиме реального времени было продемонстрировано подавляющее действие цисплатина на генную экспрессию скавенджер-рецепторов CD163, CD206 (рис. 1). Однако, цисплатин не оказывал существенного влияния на экспрессию LYVE1 и стабиллина-1.

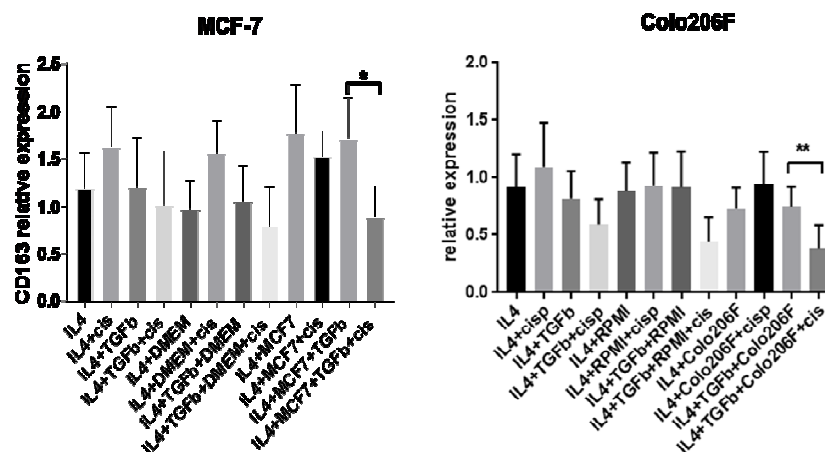


Рис. 1. Анализ экспрессии CD163 в макрофагах, стимулированных супернатантами опухолевых клеток MCF-7 и Colo206F после добавления цисплатина, при помощи ПЦР в режиме реального времени

Методом конфокальной микроскопии было установлено, что экспрессия CD206 и стабиллина-1 снижается при добавлении цисплатина в присутствии как супернатантов от MCF-7, так и от Colo206F. В присутствии цисплатина также наблюдалась тенденция снижения экспрессии CD163 (рис. 2). Экспрессия LYVE1 незначительно повышалась при добавлении цисплатина в образцах с супернатантами от MCF-7, и не наблюдалось значительных различий в экспрессии LYVE1 в образцах Colo206F.

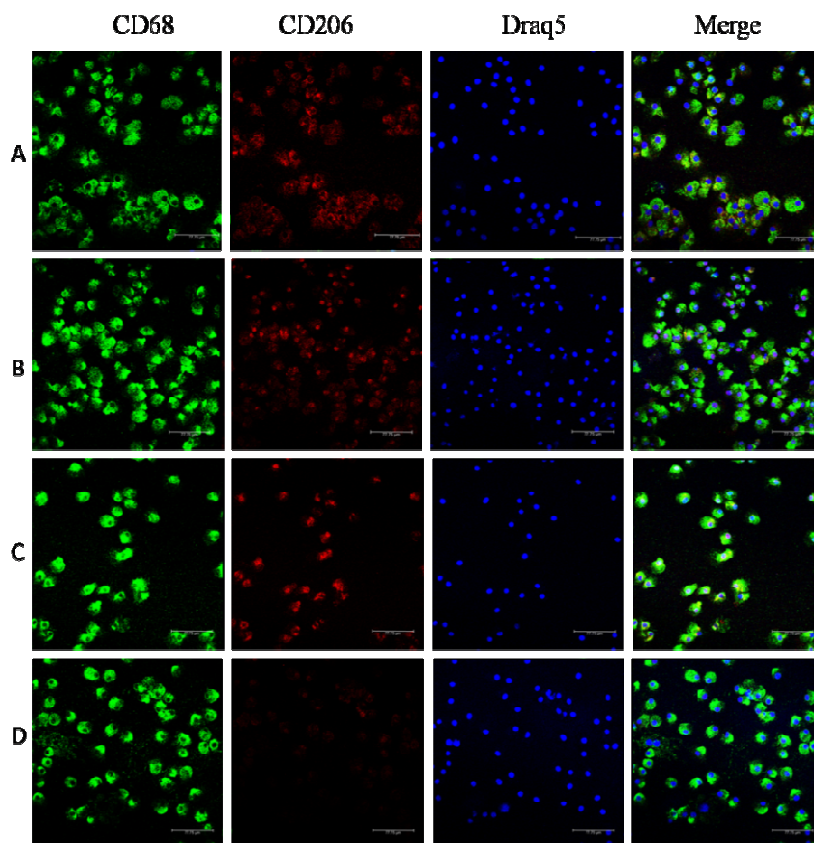


Рис. 2. Конфокальная микроскопия макрофагов, стимулированных IL4 и опухолевыми супернатантами от MCF-7 (A, B) и Colo206F (C, D). На рисунках A и C изображены макрофаги без добавления цисплатина, на рисунках B и D после добавления цисплатина

Выводы. Таким образом, было установлено, что цисплатин оказывает общее подавляющее действие на сканенджинг потенциал макрофагов как рака молочной железы, так и колоректального рака, за исключением повышения потенциала для эндоцитоза гиалуроновой кислоты в модельных макрофагах опухоли груди, но не рака кишечника.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №14-15-00350.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Galluzzi L., Buqué A., Kepp O., Zitvogel L., Kroemer G. (2015). Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*. v. 28, no. 6, pp. 690-714.
2. Bracci L., Schiavoni G., Sistigu A., Belardelli F. (2014). Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ*. v. 21, no. 1, pp. 15–25.
3. Чердынцева Н.В., Митрофанова И.В., Булдаков М.А., Стахеева М.Н., Патышева М.Р., Завьялова М.В., Кжышковска Ю.Г. // Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии // Бюллетень сибирской медицины – 2017. – Т. 16. – № 4. – С. 60–73.

ГЕКСААЗОИЗОВЮРЦИТАН – АНАЛЬГЕТИК НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

К.А. Лопатина, Е.А. Сафонова, О.Ю. Рыбалкина

Научный руководитель: в.н.с., д.б.н. С.Г. Крылова

«Томский национальный исследовательский медицинский центр

Российской академии наук», Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной

медицины имени Е.Д. Гольдберга,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634028

E-mail: k.lopatina@pharmso.ru

BIOCOMPOSITES FOR BONE TISSUE REGENERATION

К.А. Lopatina, E.A. Safonova, O.Y. Rybalkina

Scientific Supervisor: Dr. Krylova S.G.

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk NRMC, Russia, Tomsk, Lenin

ave., 3, 634028

E-mail: k.lopatina@pharmso.ru

Abstract. *The results of the expressed analgesic activity of the novel compound 4-(3,4-dibromothiophenecarbonyl)-2,6,8,12-tetraacetyl-2,4,6,8,10,12 hexa-azatetracyclo [5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}] dodecane (tioviurcin) were obtained under the conditions of the chemogenic activation model of the TRPA1 channel "formalin test" and in the selective test with agonist TRPV1 channels "Capsaicin test". It was found that tioviurcin in the preventive single intragastric administration via the probe at doses of 100 and 200 mg / kg effectively blocks nociceptive reactions caused by activation of TRPA1 and TRPV1 ion channels.*

Введение. В настоящее время одним из новых направлений фармацевтики является поиск кандидатов для создания на их основе ненаркотических анальгетиков для купирования сильной и средней боли. Объектом настоящего исследования явилось соединение 4-(3,4-дибромтио-фенкарбонил)-2,6,8,12тетраацетил-2,4,6,8,10,12гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}] додекан (далее тиовюрцин). Пилотные исследования острой токсичности показали, что тиовюрцин соответствует требованиям 4 класса опасности «вещества малоопасные». Цель исследования - изучение анальгетической активности тиовюрцина в условиях формалинового и капсаицинового теста на мышах.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 50 аутбредных половозрелых мышах-самцах CD1, 48 мышах-самцах линии СВА (возраст 7-8 недель), первой категории, конвенциональных. Животные получены из отдела экспериментального биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ (сертификат здоровья животных). Содержание животных и дизайн экспериментов были одобрены Биоэтическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол JACUSC №96092015) и соответствовали директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях; Приказу МЗ РФ от 1 августа 2016 N 199н [1].

Исследуемая инновационная молекула представляет собой полиазотистое полициклическое соединение каркасного строения – 4-(3,4-дибромтиофенкарбонил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12 гексаазатетрацикло [5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}] додекан.

Тиовюрцин вводили превентивно однократно внутрь через зонд в диапазоне доз 50-200 мг/кг. В качестве препаратов сравнения использовали диклофенак в дозе 10 мг/кг, кеторолак – в дозе 6 мг/кг. Через 1 ч после введения препаратов инъецировали 20 мкл 2 % водного раствора формалина (формалиновый тест) или 10 мкл раствора капсаицина (капсаициновый тест) интраплантарно в подушечку задней лапы. Интенсивность болевого ответа регистрировали по количеству и продолжительности паттернов болевых реакций (облизываний, потряхиваний) инъецированной лапы в течение 60 минут (формалиновый тест) 15 мин (капсаициновый тест) для каждой мыши.

Для всех данных применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего. Межгрупповые различия оценены с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и углового преобразования Фишера (ϕ). При $p < 0,05$ различия считали достоверными.

Результаты и обсуждение. Первая фаза формалинового теста характеризует острую боль, возникающую в ответ на инъекцию химического раздражителя, и связана в основном с прямой активацией тонких немиелиновых C-волокон, большинство из которых передаёт импульсацию от болевых рецепторов, в данном случае TRPA1 каналов [2, 3]. Во II фазе формалинового воспаления тиовюрцин в дозах 100 и 200 мг/кг уменьшал количество типичной для данного теста поведенческой реакции облизывания лап в 3,4 раза ($P < 0,05$) и 3,2 раза ($P < 0,05$) относительно данных контрольной группы (рис. 1).

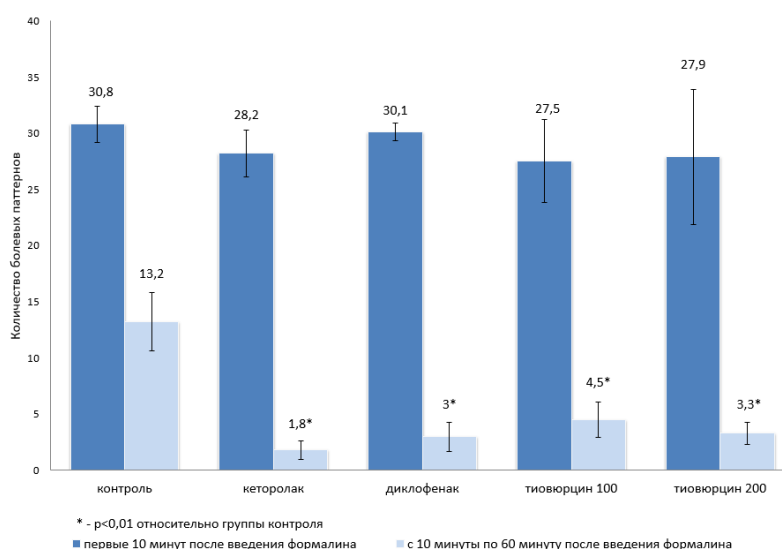


Рис. 1. Болевая реакция у мышей в интервале 40-50 мин после введения формалина

Применение кеторолака вызывало значительное снижение выраженности болевой реакции в ответ на введение капсаицина у мышей-самцов линии СВА: увеличение в 4,2 раза ($P < 0,05$) латентного периода развития болевого ответа, снижение количества облизываний в 1,9 раза ($P < 0,05$), числа встряхиваний лапы – в 3,5 раза ($P < 0,05$) относительно аналогичных данных контрольной группы. При этом продолжительность болевой реакции снизилась в 2,4 раза ($P < 0,01$).

Механизм развития болевой реакции связан с активацией ионных каналов на ноцицепторах в тканях при химическом и механическом повреждении. Такое повреждение успешно провоцируется введением капсаицина – прямого агониста TRPV1 каналов [4, 5]. В капсаициновом тесте тиовюрцин проявил

дозозависимый анальгетический эффект, сравнимый по выраженности с препаратом сравнения кеторолаком. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Показатели обезболивающей активности тиовюрцина при превентивном однократном внутрижелудочном введении в условиях «Капсаицинового теста» у мышей-самцов линии СВА ($X \pm m$)

Группа животных, доза препарата (число животных)	Латентное время болевой реакции, с	Количество		Суммарное время облизываний, с	Продолжительность болевой реакции, с
		облизываний	встряхиваний		
1. Контроль вода очищенная, (n=8)	8,8±1,8	9,4±1,6	5,6±1,3	86,6±20,6	820,0±31,1
2. Кеторолак, 6 мг/кг (n=10)	36,6±13,1*	5,0±0,9*	1,6±0,5*	38,4±16,5	347,6±79,6*
3. Тиовюрцин, 50 мг/кг (n=10)	62,8±21,6*	8,7±2,0	2,6±1,0	82,0±35,1	579,4±57,9*
4. Тиовюрцин, 100 мг/кг (n=9)	18,7±5,0*	6,3±0,9	1,4±0,4**	30,4±10,2**	421,4±75,0*
5. Тиовюрцин, 200 мг/кг (n=10)	61,2±20,1*	5,2±1,2*	1,6±0,7*	20,6±5,0**	326,6±86,4*

Выводы. Таким образом, исследования инновационной молекулы в условиях моделей «Капсаициновый тест» и «Формалиновый тест» свидетельствуют об его взаимодействии с биомишенями TRPV1 и TRPA, обуславливающим выраженный анальгетический эффект. По совокупности полученных данных можно заключить, что малотоксичное соединение тиовюрцин эффективно блокирует ноцицептивные реакции на супраспинальном и периферическом уровнях организации болевой чувствительности, что обуславливает перспективность дальнейшего его исследования в качестве анальгетического средства. Данная работа выполняется в рамках реализации Государственного контракта № 14.N08.11.0179 для выполнения прикладных научных исследований и экспериментальных разработок для государственных нужд.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова [и др.] – Москва: Гриф и К, 2013. – 944
2. McNamara C.R., Mandel-Brehm J., Bautista D.M. et al. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, no.104(33), pp.13525–13530.
3. Чайка А.В., Черетаев И.В., Хусаинов Д.Р. Методы экспериментального доклинического тестирования анальгетического действия различных факторов на лабораторных крысах и мышах // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. – 2015. – Т. 1. – № 1 (67). – С. 161–173.
4. Ruigrok H. J., Shahid G., Goudeau B. et al. (2017). Full-Spectral Multiplexing of Bioluminescence Resonance Energy Transfer in Three TRPV Channels. *Biophysical Journal*, no. 112, pp. 87–98.
5. Moiseenkova-Bell V.Y., Wensel T.G. (2009). Hot on the trail of TRP Channel Structure. *The Journal of General Physiology*, no. 133(3), pp. 239–244.

**ГЕТЕРОГЕННОСТЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ TH2-ЛИМФОЦИТОВ И ILC2 В МИКРООКРУЖЕНИИ
МОРФОЛОГИЧЕСКИ ОБОСОБЛЕННЫХ СТРУКТУР ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И СВЯЗЬ С ЛИМФОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ**

Л.С. Ляпунова, К.О. Завгородская, Л.А. Таширева

Научный руководитель: профессор, д.м.н, М.В. Завьялова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный

исследовательский медицинский центр Российской академии наук»,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

E-mail: lyapunovalilya@mail.ru

**THE HETEROGENEITY OF TH2-LYMPHOCYTES AND ILC2 THE DISTRIBUTION IN THE
MICROENVIRONMENT OF THE MORPHOLOGICALLY DISTINCT STRUCTURES OF INVASIVE
BREAST CARCINOMA AND THE ASSOCIATION WITH LYMPHOGENOUS METASTASIS**

L.S. Lyapunova, K.O. Zavgorskaya, L.A. Tashireva

Scientific supervisor: Prof., MD. Zavyalova M.V.

Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,

Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634050

E-mail: lyapunovalilya@mail.ru

***Abstract.** Inflammation plays an important role in a tumor disease. Th2 like type of IIR (immunoinflammatory reaction) is associated with an unfavorable course that can be realized by both the adaptive immunity (Th2-lymphocytes) and innate immunity (ILC2). Currently, the prognostic significance of TIL (tumor infiltrating lymphocyte) for triple negative and Her2-positive breast cancer (BC) is showed but not for luminal forms. One of the possible reasons is intratumoral morphological heterogeneity of the invasive breast carcinoma of the nonspecific type (IC NST). In this study, we had shown the heterogeneity of Th2-lymphocytes and ILC2 distribution in the microenvironment of various morphologically distinct structures of the IC NST. In addition, it has been shown that lymph nodes metastasis associated with a high frequency of ILC2 in the microenvironment of trabecular structures of IC NST.*

Введение. Воспаление занимает особое место в возникновении и течении опухолевой болезни. Многочисленные исследования позволили показать, что тип иммуновоспалительной реакции (ИВР), развертывающейся в микроокружении опухоли является одним из решающих факторов прогрессирования заболевания [1]. Так, с неблагоприятным течением связывают Th2 подобный тип ИВР, который может реализовываться как за счет адаптивного звена иммунитета (Th2-лимфоциты), так и за счет клеток врожденного иммунитета (ILC2). ILC (innate lymphoid cells), популяция не цитотоксических лимфоцитов, открытая D. Artis и H. Spits менее десяти лет назад, имеет сходство с различными субтипами Т-лимфоцитов как на уровне факторов транскрипции, регулирующих их дифференцировку, так и продуцируемых цитокинов. В отличие от адаптивного звена иммунной системы ILC не имеют антигенспецифических рецепторов, а реагируют на различные врожденные сигналы [2,3].

В настоящее время показана прогностическая значимость TIL для тройного негативного и Her2-позитивного рака молочной железы (РМЖ), но не для люминальных его форм [4]. Существует мнение, что одной из причин подобного развития событий может служить внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивной карциномы неспецифического типа (ИКНТ) молочной железы. ИКНТ молочной железы характеризуется формированием различных морфологически обособленных опухолевых структур, среди которых можно выделить: тубулярные, альвеолярные, солидные, трабекулярные и дискретные группы клеток, а также широкой вариабельностью их сочетания в пределах одного опухолевого узла [5]. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность лежит в основе гистологической классификации РМЖ, а оценку количества тубулярных структур, наряду с ядерным полиморфизмом и митотическим индексом, используют для определения степени злокачественности карцином. При этом РМЖ относящиеся к одному гистологическому классу часто характеризуются различным клиническим течением [6]. Возможными объяснениями данного феномена могут являться неоднородность распределения клеток иммунного инфильтрата в строме опухоли, а также разнообразие его субпопуляционного состава.

Таким образом, целью нашего исследования являлась оценка связи лимфогенного метастазирования с наличием Th2-лимфоцитов и ILC2 вблизи различных морфологических структур инвазивной карциномы молочной железы люминального типа.

Материал и методы исследования. В исследование были включены 10 больных с ИКНТ молочной железы люминального В типа T1-4N0-3M0 проходивших лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ. Средний возраст пациенток составил 56 лет (от 44 до 70 лет). Для анализа был использован операционный материал, полученный при радикальной мастэктомии или секторальной резекции. Терапия в неоадьювантном режиме ни одной из пациенток не проводилась. Из свежезамороженных образцов опухолевой ткани были приготовлены гистологические срезы окрашенные гематоксилином, а затем при помощи технологии лазерной микродиссекции PALM (Carl Zeiss, Германия) выделено микроокружение вблизи альвеолярных, тубулярных, солидных, трабекулярных опухолевых структур и отдельных групп опухолевых клеток. У каждой пациентки было изолировано не менее 100 морфологических структур каждого типа. Согласно адаптированному протоколу сорбентно-колоночным методом с помощью наборов RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, США) была выделена тотальная РНК, а затем с использованием набора QuantiTect WTA Kit (Qiagen, США) проведена амплификация транскрипта. С помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием технологии TaqMan была оценена экспрессия генов CD3, CD4 и GATA3 относительно гена рефери - ACTB.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ «Statistica 8.0». Для сравнения частоты встречаемости экспрессии маркерных генов применялся точный критерий Фишера, а результаты считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. На основании оценки экспрессии генов CD3, CD4 и GATA3 в образцах мы определяли присутствие двух типов клеток в микроокружении ИКНТ: сочетанная экспрессия генов CD3 и/или CD4 и GATA3 соответствовала присутствию Th2-лимфоцитов, экспрессия GATA3 без экспрессии генов CD3 и CD4 – ILC2.

Нами было показано, что в микроокружении тубулярных структур изучаемые клетки не встречались. В микроокружении альвеолярных структур и дискретных групп опухолевых клеток Th2-лимфоциты встречались в 10 % случаев, ILC2 – в 20 % случаев. В микроокружении солидных структур Th2-лимфоциты и ILC2 встречались в 20 % и 30 % случаев соответственно. А в микроокружении трабекулярных структур в 40 % случаев встречались ILC2, Th2-лимфоциты вблизи данного типа структур не встречались.

Затем мы оценили частоты встречаемости Th2-лимфоцитов и ILC2 в микроокружении различных морфологических структур ИКНТ молочной железы у больных с наличием и отсутствием лимфогенных метастазов. Оказалось, что достоверное чаще у больных ИКНТ с пораженными лимфатическими узлами в микроокружении трабекулярных структур встречаются ILC2 по сравнению с больными без лимфогенных метастазов (16,7 % и 75,0 % соответственно, $p < 0,05$)

Заключение. В результате исследования была показана гетерогенность распределения Th2-лимфоцитов и ILC2 в микроокружении различных морфологически обособленных структур ИКНТ молочной железы. Кроме того показано, что наличие пораженных лимфатических узлов у больных ИКНТ связано с большей частотой встречаемости ILC2 в микроокружении трабекулярных структур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Таширева Л.А., Перельмутер В.М., Манских В.Н. и др. Типы иммуновоспалительных реакций как алгоритмы взаимодействия клеток в условиях репаративной регенерации и опухолевого роста // Биохимия. – 2017. – Т. 82. – № 5. – С. 732–748.
2. Artis, D., Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, no. 7534, pp. 293-301.
3. Таширева Л.А., Завгородская К.О., Перельмутер В.М. Роль лимфоидных клеток врожденного иммунитета в течении опухолевой болезни // Цитология. – 2016. – Т. 58. – № 12. – С. 901–907.
4. Dushyanthen, S., Beavis, P. A., Savas, P., Teo, Z. L., Zhou, C., Mansour, M., Darcy, P. K., Loi, S. (2015). Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Medicine*, no. 13, pp. 202.
5. Gerashchenko, T. S., Zavyalova M. V., Denisov E. V., Krakhmal N. V., Pautova D. N., Litviakov N. V., Vtorushin S. V., Cherdyntseva N. V., Perelmuter V. M. (2017). Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer as an indicator of the metastatic potential and tumor chemosensitivity. *Acta Naturae*, no. 1, pp. 56–67.
6. Masood, S. (2016). Breast cancer subtypes: morphologic and biologic characterization. *Women's Health*, no. 1, pp. 103–119.

**ВЛИЯНИЕ КОЛЛОИДНОГО РАСТВОРА КРЕМНИЯ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ
ПАРАМЕТРЫ ПШЕНИЦЫ**

Б.И. Макаров

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Н.Н. Терещенко
Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050
E-mail: makar189@mai.ru

**INFLUENCE OF COLLOID SOLUTION OF SILICON ON
MORPHOMETRIC PARAMETERS OF WHEAT**

B.I. Makarov

Scientific Supervisor: Prof., Dr. N.N. Tereschenko
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050
E-mail: makar189@mai.ru

***Abstract.** The present work is focused on the study the influence of presowing treatment by SiO₂ nanoparticles with their different concentration (3×10^{-4} , 1.5×10^{-4} and 0.3×10^{-5}) on the Irene spring wheat seeds. The small-field experiment was carry out under the natural agroclimatic conditions of the subtaiga zone Tomsk region. It was shown the possitive effect of silica nanoparticles on the basic morphometric parameters of wheat plants (height, green mass, specific leaf area), the content of photosynthetic pigments and the collection of wheat grain from per unit..*

Введение. Одним из перспективных направлений исследований является применение препаратов на основе наноматериалов в растениеводстве для повышения урожайности сельскохозяйственных культур, в том числе наночастицы кремния.

Целью полевого эксперимента 2016 года было изучение влияния наноразмерного кремния на полевую всхожесть, морфометрические показатели и урожайность яровой пшеницы. В эксперименте кремний применяли в наиболее эффективных концентрациях из предварительных исследований.

Методы и материалы. Объектом исследования являлась яровая пшеница сорта Ирень, которая проходила предпосевную обработку раствором наночастиц SiO₂ и выращивалась в естественных агроклиматических условиях Томской области, на метровках по общепринятой методике [1] при систематическом распределении вариантов в 3-х повторениях. Отбор образцов растений для анализов проводился в фазе цветения и в конце вегетации, полевую всхожесть учитывали на 7-й день

За сутки перед посевом семена обрабатывали раствором наночастиц SiO₂ в концентрациях $3,0 \times 10^{-4}$, $1,5 \times 10^{-4}$ и $0,3 \times 10^{-4}$, контрольные семена обрабатывали дистиллированной водой. Эксперимент проводили на серой лесной оподзоленной почве с pH-5,1 и содержанием гумуса 6,5%.

В эксперименте использовали наночастицы SiO₂, средний размер частиц – 7 нм, массовая концентрация частиц в растворе составляла 30 мг/л [2].

Содержание пигментов фотосинтеза определяли в спиртовой вытяжке на спектрофотометре UV-1601 фирмы SHIMADZU (Япония) при длинах волн 665 нм, 649 нм и 440,5 нм с последующим расчетом по формулам Вернона [3]. Определение производили в флаговом листе пшеницы в фазу цветения.

Статистическую обработку результатов опыта проводили с помощью пакета программ Statistica for Windows 10.0. В таблицах 1-2 представлены средние значения показателей с ошибкой средней.

Результаты и обсуждение. Результаты полевого эксперимента выявили незначительное снижение полевой всхожести яровой пшеницы в вариантах с применением нанокремния, однако все различия с контролем оказались в пределах ошибки опыта (рисунок 1).

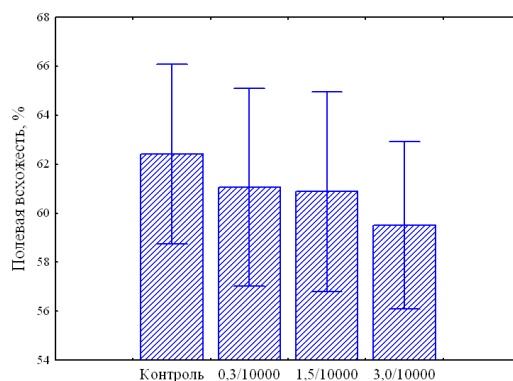


Рис. 1. Влияние нанокремния на полевую всхожесть растений яровой пшеницы

На высоту растений и зеленую массу предпосевная обработка семян нанокремнием, напротив, оказала заметное положительное влияние. При этом наибольший статистически достоверный эффект оказала обработка семян нанокремнием в концентрации SiO_2 , равной $1,5 \times 10^{-4}$ %, обеспечившей 23,4%-е увеличение зеленой массы (табл. 1). В вариантах с использованием концентраций SiO_2 ($0,3 \times 10^{-4}$ % и $3,0 \times 10^{-4}$ %) также было отмечено достоверное увеличение зеленой массы растений. Обработка наночастицами положительно сказалась на увеличении оводненности растений, а значит на повышении их засухоустойчивости (табл. 1).

Таблица 1

Основные морфометрические показатели растений яровой пшеницы в полевым опыте

Вариант	Высота растения, см.	Сырая масса 1-го растения, гр.	Сухая масса 1-го растения, гр.	Оводненность, %
Контроль	$62,6 \pm 2,0$	$7,53 \pm 0,4$	$1,09 \pm 0,1$	85,39
SiO_2 $3,0 \times 10^{-4}$	$65,6 \pm 2,1$	$8,72 \pm 0,7^*$	$1,35 \pm 0,2$	84,52
SiO_2 $1,5 \times 10^{-4}$	$70,6 \pm 2,0^*$	$9,29 \pm 0,6^*$	$1,24 \pm 0,2$	86,65
SiO_2 $0,3 \times 10^{-4}$	$70,4 \pm 1,8^*$	$8,81 \pm 0,3^*$	$1,23 \pm 0,1$	86,00

Примечание. * – Здесь и далее различия с контролем достоверны по критерию Стьюдента при $p < 0,5$

Предпосевная обработка семян нанокремнием в концентрации $0,3 \times 10^{-4}$ % способствовала 4%-му увеличению содержания пигментов фотосинтеза. Однако, не смотря на столь незначительное увеличение содержания пигментов хлорофиллов, достоверное 23,5-34,4%-е возрастание удельной площади листа (УПЛ) привело к существенному возрастанию площади фотосинтетической поверхности листьев растений и сказалось на увеличении продуктивности растений. Сбор зерна возрос во всех вариантах с предпосевной обработкой семян нанокремнием. Наименьший эффект был отмечен в варианте с концентрацией $3,0 \times 10^{-4}$ %, прибавка сбора зерна в вариантах с применением $0,3 \times 10^{-4}$ % и $1,5 \times 10^{-4}$ % концентрациями нанокремния составила 20,1 и 18,4% соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Сбор зерна яровой пшеницы (г/м²) и содержание пигментов фотосинтеза во флаговом листе пшеницы, мг/г сухой массы

Вариант	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	$\Sigma a + b$	УПЛ, см ² /гр.	Сбор зерна	
					масса зерна, гр./м ²	разница с контролем, %
Контроль	9,6	3,1	12,6	4,89 ± 0,2	136,2 ± 3,1	-
SiO ₂ $3,0 \times 10^{-4}$	9,5	3,1	12,6	6,57 ± 0,4*	142,1 ± 5,3	+4,3%
SiO ₂ $1,5 \times 10^{-4}$	9,4	3,1	12,5	6,14 ± 0,3*	161,3 ± 4,4*	+18,4%
SiO ₂ $0,3 \times 10^{-4}$	9,8	3,2	13,1	6,04 ± 0,4*	163,7 ± 2,9*	+20,1%

Заключение. Как показали результаты проведенных исследований, предпосевная обработка яровой пшеницы сорта Ирень наночастицами SiO₂ в различных концентрациях оказывает положительное воздействие на основные морфометрические параметры растений, такие как высота и зеленная масса растений, а также оводненность растений и УПЛ. При этом по большинству параметров наиболее эффективными оказались минимальная и средняя концентрации наночастиц. Предпосевная обработка семян нанокремнием в минимальной ($0,3 \times 10^{-4}$ %) и средней ($1,5 \times 10^{-4}$ %) концентрациях способствовала соответственно 20,1 и 18,4%-му увеличению сбора зерна пшеницы с единицы площади.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Под ред. Доспехов Б.А. - М.: Агропромиздат, 1985. - 351 с.
2. Svetlichnyi, V., Izaak, T., Lapin, I., Martynova, D., Stonkus, O., Stadnichenko, A., & Boronin, A. (2015). Physicochemical investigation of nanopowders prepared by laser ablation of crystalline silicon in water. *Advanced Powder Technology*, no 26, pp. 478–486.
3. Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. А.А. Шлык. - М.: Наука, 1971. - 154 -170 с.

**ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНОВ *ADAMTS1*, *RBFOX2* И *THBS1* НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ
РЕГУЛЯЦИЮ И КЛОНАЛЬНУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК
В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ *IN VITRO***

А.А. Мурашкина¹, Р.Р. Савченко²

Научный руководитель: с.н.с., к. б. н. С.А. Васильев

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

²НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Россия, г. Томск, ул. Наб. р. Ушайки, 10, 634050

E-mail: anastasiya.murashkina.97@mail.ru

**EFFECTS OF KNOCKOUT OF *ADAMTS1*, *RBFOX2* AND *WHSC1* GENES ON TRANSCRIPTION
REGULATION AND CLONOGENIC SURVIVAL IN THE MODEL SYSTEM *IN VITRO***

A.A. Murashkina¹, R.R. Savchenko²

Scientific Supervisor: S.A. Vasilyev, PhD

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

²Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMC, Russia, Tomsk, Nab. r. Ushaiki, 10, 634050

E-mail: anastasiya.murashkina.97@mail.ru

Abstract. *In this study, we evaluated the expression level and clonogenic survival of cell lines with a mutation of the ADAMTS1, RBFOX2, and THBS1 genes generated by CRISPR/Cas9 technology. The gene expression profile was analyzed by expression microarray. It was found that knockout of all analyzed genes leads to a decrease in their own expression. In addition, the knockout of these genes leads to significant changes in the expression of other genes in the cell lines. Clonogenic survival of the lines was decreased in the cell lines with knockout of ADAMTS1 and RBFOX2 genes after exposure to 2 Gy of γ -rays.*

Введение. Установление и изучение генов, определяющих индивидуальную радиочувствительность человека, является одной из приоритетных задач в современной терапии онкологических заболеваний. В наших предварительных исследованиях были выявлены гены, дифференциальная экспрессия которых оказалась связана с различной эффективностью репарации двунитевых разрывов ДНК, а именно: *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1*. Продукты генов *ADAMTS1* и *THBS1* являются металлопротеиназами межклеточного матрикса и принимают участие в передаче в клетку различных сигналов [1,2]. Продукт гена *RBFOX2* участвует в регуляции альтернативного сплайсинга [3]. Поэтому важным вопросом является выявление механизмов, по которым данные гены могут влиять на радиационно-индуцированный клеточный ответ и эффективность репарации двунитевых разрывов ДНК. В связи с этим, целью настоящего исследования стал анализ влияния нокаута генов *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1* на транскрипционный профиль и клональную выживаемость в модельной системе *in vitro*.

Материалы и методы исследования. В качестве материала в данном исследовании использовалась клеточная линия HeLa, на основе которой с помощью технологии CRISPR/Cas9 были созданы клеточные линии, нокаутные по генам *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1*. Линии культивировались до 3 пассажа, затем были подвергнуты воздействию ионизирующего γ -излучения в дозе 2-8 Гр для

оценки клональной выживаемости и 2 Гр для анализа экспрессии генов. Для оценки клональной выживаемости клетки выращивались в течение 2 недель, затем колонии фиксировались и окрашивались, после чего производился подсчёт и статистическая обработка полученных данных. Выделение и очистка РНК с помощью реагента «Лири» (БиоЛабМикс, Россия) и микроколонок RNeasy (Qiagen, США) из указанных линий была произведена через 30 мин после воздействия γ -излучения. Оценка качества РНК осуществлялась с использованием системы 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Анализ уровня экспрессии производился с помощью экспрессионного чипа SurePrint G3 Human Gene Expression v2 8x60K (Agilent Technologies, США).

Результаты. Клональная выживаемость наиболее выражено отличалась в нокаутных клеточных линиях после воздействия в дозе 2 Гр: отмечалось снижение клональной выживаемости относительно исходной линии HeLa при нокауте генов *ADAMTS1* - в 1,9 раза ($p = 0,014$) и *RBFOX2* - в 1,8 раза ($p = 0,017$).

Полнотранскриптомный анализ показал, что нокаут генов *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1* приводит к снижению их собственной экспрессии: экспрессия гена *ADAMTS1* снижалась при нокауте в 2,3 раза, а экспрессия гена *THBS1* при его нокауте снижалась в 2,1 раза. Кроме того, нокаут гена *RBFOX2* приводил к снижению экспрессии не только гена *RBFOX2* (в 2,1 раза), но и к снижению экспрессии гена *THBS1* (3,2-3,6 раза). Это указывает на возможную роль гена *RBFOX2* в транскрипционной регуляции экспрессии гена *THBS1*. Помимо этого, нокаут вышеуказанных генов приводит к значительным изменениям экспрессии других генов в клеточных линиях (табл. 1). Наиболее сильные изменения вызываются нокаутом гена *RBFOX2*, что может объясняться его известной ролью в регуляции альтернативного сплайсинга.

Таблица 1

Влияние нокаута генов *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1* на экспрессию генов в клеточных линиях

Нокаутированный ген	Число генов со сниженной экспрессией в нокаутной клеточной линии (>2 раз)	Число генов с повышенной экспрессией в нокаутной клеточной линии (>2 раз)
<i>ADAMTS1</i>	42	50
<i>RBFOX2</i>	358	516
<i>THBS1</i>	83	79

Выводы. Нокаут генов *ADAMTS1* и *RBFOX2* приводит не только к повышению радиочувствительности клеточных линий, но и связан со значительными изменениями в транскрипционном профиле, что может указывать на возможную роль этих генов в реализации радиационно-индуцированного транскрипционного клеточного ответа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bourd-Boittin K., Bonnier D., Leyme A., et al. (2011) Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1 as a central activator of transforming growth factor beta. *Hepatology*, Vol. 54, no. 6, pp. 2173-2184.
2. Resovi A., Pinessi D., Chiorino G., et al. (2014) Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. *Matrix Biol*, Vol. 37, pp. 83-91.
3. Arya A.D., Wilson D.I., Baralle D., et al. (2014) RBFOX2 protein domains and cellular activities. *Biochem Soc Trans*, Vol. 42, no. 4, pp. 1180-1183.

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СОМАТО-СТВОЛОВОГО ПЕРЕХОДА И МАКРОФАГ-
АССОЦИИРОВАННЫХ ГЕНОВ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Ю.А. Небова, М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов

Научный руководитель: д.б.н. Н.В. Литвяков

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: julia.nebova@gmail.com

**EXPRESSION OF SOMATIC-STEM TRANSITION GENES AND MACROPHAGE-ASSOCIATED
GENES IN BREAST TUMOR**

J.A. Nebova, M.K. Ibragimova, M.M. Tsyganov

Scientific Supervisor: Dr. N.V. Litviakov

Tomsk State University, Russian, Tomsk, Lenina str., 36, 634050

E-mail: julia.nebova@gmail.com

***Abstract.** In a study of breast cancer of 68 patients before and after neoadjuvant chemotherapy, overexpression in the residual tumor of 14/16 genes of the somato-stem transition was shown in patients with metastases that subsequently developed. This confirms our hypothesis about the important role of activation of the ability to somato-stem transition for tumor metastasis, which occurs under the influence of neoadjuvant chemotherapy. A new prognostic factor has been established, which makes it possible to predict the occurrence of hematogenous metastases with a sensitivity of 69%, a specificity of 94%, and a diagnostic accuracy of 82%.*

Введение. Системная химиотерапия прочно вошла в арсенал противоопухолевых методов, однако при ее применении у 20–40% онкологических больных наблюдается прогрессирующее злокачественное заболевание, основной причиной которого является клональная экспансия минорных резистентных клонов. В 2015–2016 гг. при исследовании клональной эволюции опухоли молочной железы в процессе предоперационной (неоадьювантной) химиотерапии (проект РФФИ №15-04-03091 в лаборатории онковирусологии НИИ онкологии Томского НИМЦ впервые было показано, что появление в процессе НАХТ или сохранение в резидуальной опухоли после химиотерапии опухолевых клонов, несущих амплификации в 2-х и более регионах: 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 13q, 16p, 18q, 19p, 19q, сопряжено со 100% гематогенным метастазированием. Другими словами, был выявлен абсолютный прогностический фактор для рака молочной железы, который позволяет со 100% эффективностью прогнозировать исход заболевания [1, 2]. Также установлено, что для формирования морфофенотипа опухоли принципиальное значение имеют особенности взаимодействия опухоли и микроокружения в контексте формирования опухолевой экосистемы. Риск метастазирования определяется как биологическими характеристиками опухоли, так и свойствами микроокружения в первичном очаге, а также локальными и системными факторами, влияющими на формирование метастатических ниш. В этой связи следует уделить особое внимание опухолеассоциированным макрофагам (ОАМ), являющимся основными клетками врожденного иммунитета, которые регулируют взаимоотношения инфильтрирующих иммунокомпетентных клеток с

опухолевыми клетками и с другими компонентами микроокружения, пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез, а также могут вовлекаться в реализацию ответа на химиотерапию [3].

Целью данного исследования являлось изучение экспрессии генов сомато-стволового перехода (5p15.33 *TERT*; 6p21.31 *OCT3*; 7q32.1 *SMO*; 8q24.21 *MYC*; 8q11.21 *SNAI2*; 9p21.2 *MOB3B*; 9q22.33 *TGFBR1*; 9q31.2 *KLF4*; 10p11.23 *BMII*; 10p13 *VIM*; 13q12.2 *FLT3*; 16p11.2 *LAT*; 18q21.1 *SMAD2*; 19p13.3 *LMNB2*; 19p13.13 *KLF1* и 19q13.2 *TGF-β1*) и макрофаг-ассоциированных генов (1p13.2 *YKL39*; 17q12 *CCL18*; 17p13.1 *CD68*; 10p12.33 *CD206*) в опухоли молочной железы.

Материалы и методы. Анализ производился на основе материала 68 больных РМЖ с морфологически верифицированным диагнозом и клинической стадией ПА – ПИВ (T₁₋₄N₀₋₃M₀) люминального В, триждынегативного и HER2-позитивного молекулярных подтипов, в возрасте 26-68 лет (средний возраст 47,43 ± 0,78 лет). Больные получали 2-4 курса неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) по схемам FAC (5-fluorouracil 600 мг/м², adriamycin 50 мг/м² и cyclophosphamide 600 мг/м² один раз в 3 недели), САХ (cyclophosphamide 100 мг/м² внутримышечно, adriamycin 30 мг/м² внутривенно, xeloda 1200 мг/м² перорально), монотерапия таксотером (100 мг/м² часовая инфузия в день), СМХ (cyclophosphamide 100 мг/м² внутримышечно, methotrexate 30 мг/м² внутривенно, xeloda 1200 мг/м² перорально). Через 3-5 недель после НАХТ проводилась операция в объеме радикальной или подкожной мастэктомии, радикальной резекции, секторальной резекции с аксиллярной лимфаденэктомией или другого вида органосохранной операции, затем больным проводили 2 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. У 14/62 (22%) больных в течение 5-ти лет после лечения развились гематогенные метастазы.

РНК из биопсии опухоли до лечения и операционного материала после НАХТ выделяли при помощи наборов RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany). Экспрессию генов сомато-стволового перехода оценивали при помощи метода обратнo-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (qPCR) с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan. Амплификации локусов 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 13q, 16p, 18q, 19p, 19q определяли при помощи микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, USA).

Результаты. Было установлено влияние на уровень экспрессии отдельных генов сомато-стволового перехода в опухоли до лечения и после НАХТ возраста больных, рецепторного статуса и молекулярного подтипа (экспрессия гена *OCT3* в резидуальной опухоли больных моложе 45 лет статистически значимо выше, чем у пациенток старше 45 лет (p=0,0189)). В опухоли рецептор (ER и PR) позитивных больных до лечения и после НАХТ значимо выше экспрессия генов теломеразы и *TGFβ1* по сравнению с ER- и PR-негативными больными. У больных люминальным В РМЖ уровень экспрессии генов *MYC* и *TGFβ1* в биопсии выше, чем у больных HER2-позитивным РМЖ. Также, была выявлена корреляция между экспрессией генов сомато-стволового перехода и макрофаг-ассоциированными генами в опухоли до лечения: уровень экспрессии генов *FLT3* и *KLF1* статистически значимо выше у больных с CCL18+, чем у больных с CCL18- (p=0,0160; p=0,0212). Аналогично, уровень экспрессии генов *MYC*, *SNAI2*, *MOB3B* и *VIM* значимо выше в CD206+ опухолях, по сравнению с CD206-; наблюдается сниженный уровень экспрессии гена *KLF1* в опухолях, обладающих морфофенотипами YKL39+CCL18+ и YKL39+CCL18-, по отношению к опухолям с морфофенотипом YKL39-CCL18- (p=0,0359; p=0,0376).

До проведения лечения количество гиперэкспрессированных генов сомато-стволового перехода в опухоли у больных без метастазов и с метастазами не различается и составляет 6/16 (38%) и 7/16 (44%), соответственно. После проведения НАХТ в остаточной резидуальной опухоли у больных без метастазов количество гиперэкспрессированных генов сомато-стволового перехода остается прежним, в то время как у больных с развившимися впоследствии метастазами после проведения НАХТ количество гиперэкспрессированных генов увеличивается в два раза и составляет 14/16 (88%). Это подтверждает нашу гипотезу о важной роли активации способности к сомато-стволовому переходу для метастазирования опухолей, причем в данном случае активация происходит под действием неоадьювантной химиотерапии. Была установлена предиктивная значимость экспрессии генов *TGFBR1* и *KLF1* в опухоли молочной железы до лечения. При уровне экспрессии гена *TGFBR1* меньше 0,8 плохой ответ на НАХТ отмечается только у 6 из 39 (15%) больных, в то время при экспрессии больше 0,8 у 13 из 21 (62%) больных отмечается отсутствие ответа на НАХТ (по критерию Фишера $p=0,0004$). Если в опухоли до лечения ген *KLF1* не экспрессируется, то 13/24 (54%) не отвечают на химиотерапию, при ненулевой экспрессии гена *KLF1* только 6/36 (17%) не отвечают на НАХТ (по критерию Фишера $p=0,004$). Одновременная гиперэкспрессия генов *OCT3*, *LAT* и *LNMB2* в остаточной резидуальной опухоли после НАХТ сопряжена с неблагоприятным исходом. При гиперэкспрессии в остаточной резидуальной опухоли трех генов *OCT3*, *LAT* и *LNMB2* у 11/16 больных (69%) развиваются гематогенные метастазы. При гипоекспрессии хотя бы одного из этих генов 5-ти летняя безметастатическая выживаемость составляет 94% (34/36) (по критерию Фишера $p=0,000004$). Чувствительность прогноза метастазирования составляет 69%, специфичность 94%, диагностическая точность 82%.

Заключение. Таким образом, показана гиперэкспрессия в резидуальной опухоли после НАХТ генов сомато-стволового перехода у больных с развившимися впоследствии метастазами. Предиктивная значимость экспрессии генов *KLF1* и *TGFBR1* в опухоли до лечения позволяет прогнозировать непосредственную эффективность НАХТ. Установлен новый прогностический фактор, который позволяет прогнозировать возникновение гематогенных метастазов чувствительностью 69%, специфичностью 94% и диагностической точностью 82%.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-15-01203.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Литвяков Н.В. Естественная и химио-индуцированная клональная эволюция опухоли // Биохимия. – 2017. – Т. 82. – № 4. – С. 572-586.
2. Litviakov N., Cherdyntseva N., Ibragimova M., Tsyganov M., Doroshenko A., Kazantseva P., Kzhyshkowska J., Slonimskaya E. (2016). The clonal evolution of a breast tumor during neoadjuvant chemotherapy and metastasis. *Annals of Oncology*, no. 27, pp. 299.
3. Чердынцева Н.В., Митрофанова И.В., Булдаков М.А., Стахеева М.Н., Патышева М.Р., Завьялова М.В., Кжышковска Ю.Г. Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии // Бюллетень сибирской медицины. – 2018. – Т. 16. – №. 4. – С. 61-74.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИМФЕДЕМЫ МЕТОДОМ МНОГОФОТОННОЙ МИКРОСКОПИИ
ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ**

В.В. Николаев, А.С. Курочкина, Д.А. Вражнов

Научный руководитель: д.ф.-м.н. Ю.В. Кистенев

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

Институт микрохирургии, Томск, Россия, г. Томск, ул Ивана Черных, 96, 634063

Сибирский государственный медицинский университет, Россия, г.Томск, Московский тракт, 2, 634050

E-mail: vik-nikol@bk.ru

**RESEARCH ON LYMPHEDEMA BY METHOD OF HIGH-RESOLUTION MULTIPHOTON
MICROSCOPY**

V.V. Nikolaev, A.S. Kurochkina, A.I. Knyazkova, D.A. Vrazhnov

Scientific Supervisor: Yu.V. Kistenev

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina Str. 36, 634050

The institute of microsurgery, Russia, Tomsk, I. Chernykh st., 96, 634063

Siberian state medical university, Russia, Tomsk, Moscovsky Trakt St., 2, 634050

E-mail: vik-nikol@bk.ru

***Abstract.** In this paper results of iv-vivo measurements for healthy volunteers and people, with verified diagnosis of lymphedema, obtained with two-photon tomography with FLIM mode on MPTflex equipment (JenLab GmbH) are presented. In the study, eight healthy people and eight people with lymphedema disease participated. The papillary layer of the skin was analyzed at a depth of about 100 μm . In the course of the study, a small redistribution of autofluorescence lifetimes was observed for healthy volunteers and people with lymphedema disease. However, the main component composition in similar parts of the papillary dermis don't not change significantly. This allows to make assumption that as a result of the development of the disease, structural changes occur that do not significantly affect the component composition of the tissue.*

Введение. Заболевание лимфедема связано с нарушениями в работе лимфатической системы. Данное заболевание может быть как врожденным, так и полученным в результате хирургических вмешательств. Прогрессирование заболевания, вызванное аномальным накоплением тканевой жидкости с высоким содержанием белка, приводит к разрастанию волокнистой соединительной ткани, гипертрофии жировой ткани и воспалению [1]. На данный момент лечение данного заболевания осложнено множеством факторов, в том числе и сложностью достоверной клинической оценки заболевания [2]. С появлением современных многофотонных лазеров появилась возможность проводить измерения подкожно-жировой клетчатки in-vivo без оказания негативного воздействия на объект исследования. [3,4]. Более того, при помощи технологии определения времени жизни автофлуоресценции, появилась возможность разделять объекты по времени жизни. Так, в работе [5] показаны вещества, которые могут быть проанализированы при определенных настройках лазера, в работе [6] была показана возможность выделить капилляры в папиллярном слое кожи. Таким образом,

многофотонная микроскопия, на основе двухфотонной флуоресценции или генерации второй гармоники, обладает большим потенциалом для неинвазивной оценки и мониторинга морфологических структур и функциональных состояний живых тканей [4, 7].

Материалы и методы. В данной работе рассматривались две группы пациентов: здоровые добровольцы и пациенты с заболеванием лимфедема, проходящие лечение в АНО «НИИ Микрохирургии ТНЦ СО РАМН». Протокол исследования был одобрен институциональным комитетом НИИ Микрохирургии, а каждым участником было подписано «Информационное согласие» на участие в исследовании. В исследовании участвовала группа пациентов с II стадией лимфедемы конечностей (целевая группа) в возрасте от 23 до 68 лет ($n = 8$) и группы здоровых добровольцев в возрасте от 19 до 65 лет ($n = 8$). В первую группу вошли 2 пациента с первичной лимфедемой нижних конечностей, 2 пациента со вторичной лимфедемой верхних конечностей (после подмышечной лимфаденэктомии, вызванной раком молочной железы) и 4 пациенты со вторичной лимфедой нижних конечностей, вызванные различными причинами, а именно обширные ожоги кожи (1 случай), после травмы (1 случай) и после хирургического лечения рака шейки матки в сочетании с рентгенотерапией (2 случая).

Изображений подкожножировой клетчатки были получены на двухфотонном микроскопе MPTflex (Jenlab GmbH, Германия). Рабочая длина волны лазера накачки составляла 760 нм. Были изучены папиллярный слой кожи на глубине порядка 100 мкм. В качестве начальной глубины положения лазера был выбран роговой слой кожи. Каждое измерение проводилось с использованием FLIM режима и специального программного пакета «Becker & Hickl». Исходные данные представляли собой матрицу размером $128 \times 128 \times 256$ пикселей, размер изображения составлял 75×75 мкм с боковым разрешением около 1 мкм и с продольным разрешением ниже 2 мкм. Полученные данные анализировались при помощи приложения SPCImage (Becker & Hickl) и Python.

В данной работе были проанализировано время жизни автофлуоресценции (АФ). Сигнал АФ обычно оценивается с использованием двух экспоненциального приближения следующим образом

$$F(t) = a_1 e^{-t/t_1} + a_2 e^{-t/t_2},$$

где a_1 , a_2 , t_1 , t_2 - амплитуды и времена жизни сигнала АФ. Среднее время жизни t_m выглядит следующим образом

$$t_m = \frac{t_1 a_1 + t_2 a_2}{a_1 + a_2},$$

и данная величина часто используется для анализа данных FLIM. Пространственное распределение t_m значения для здоровой ткани и ткани лимфедемы представлено на рисунке 1.

Результаты. Всего было проанализировано более 20 изображений для каждого класса. Отмечается небольшое изменение величины t_m , но в целом распределение для здоровой ткани и ткани с диагнозом лимфедема очень близко. Таким образом, показано, что содержание флуоресцентных веществ, включая эластин, для исследуемых групп практически не изменяется, основное различие между группами связано с пространственными изменениями структуры коллагена.

Заключение. В ходе проведения исследований отмечено перераспределение времен жизни автофлуоресценции для здоровых добровольцев и людей с заболеванием лимфедема, однако основной компонентный состав в похожих участках папиллярного дермиса значительно не изменялся. Это

позволяет сделать предположение, что в результате развития заболевания происходят структурные изменения, которые значительным образом не влияют на компонентный состав ткани.

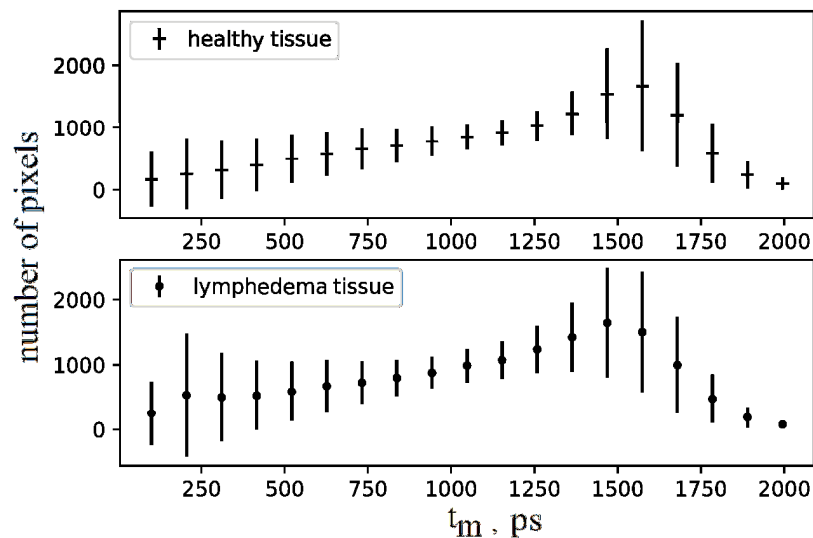


Рис. 1. Среднее значение и стандартное отклонение для среднего времени жизни автофлуоресценции t_m .

Выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-42-703012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rockson S.G. (2001). Lymphedema. Am J Med. no. 110, pp. 288–295.
2. Becker C., Assouad J., Riquet M., Hidden G. (2006). Postmastectomy lymphedema: long-term results following microsurgical lymph node transplantation. Ann Surg., no. 243, pp. 313–315.
3. Zipfel W.R., Williams R.M., Webb W.W. (2003). Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. Nat Biotechnol., no. 21, pp. 1369–1377,
4. Koehler M.J., König K., Elsner P. (2006). In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. Opt Lett., no. 19. pp. 2879–2881
5. Dancik Yu., Favre A. et al. (2013) Use of multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging to investigate skin pigmentation in-vivo. Journal of Biomedical Optics., no. 18(2), pp. 026022.
6. Shirshin E.A., Gurfinkel Y.I., Priezzhev A.V., Fadeev V.V., Lademann J., Darvin M.E. (2017). Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization. Sci Rep., no. 7(1), pp. 1171.
7. Zoumi A., Yeh A., Tromberg B.J. (2002). Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. Proc Natl Acad Sci USA, no. 99. pp. 11014–11019.

**ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ИНВАЗИВНОГО РОСТА РАКА МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ, СВЯЗЬ ИХ ЭКСПРЕССИИ С ПРОГНОЗОМ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

Н.М. Новиков, Т.С. Геращенко, Н.В. Крахмаль

Научный руководитель: к.б.н. Е.В. Денисов

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634050

E-mail: drcoxisefoxi@gmail.com

**SEARCH FOR MARKERS OF INVASIVE GROWTH IN BREAST CANCER: ASSOCIATION WITH
DISEASE PROGNOSIS**

N.M. Novikov, T.S. Gerashchenko, N.V. Krakhmal

Scientific Supervisor: E.V. Denisov, PhD

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina Str. 36, 634050

Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, Russia, Tomsk, Kooperativny Str. 5, 634050

E-mail: drcoxisefoxi@gmail.com

***Abstract.** In the present study, we analyzed the gene expression profiles of various morphological structures of breast cancer (GEO, GSE80754) to identify new markers of invasion and to assess their association with disease prognosis. Nine proteins (KIF14, DSC3, WAVE, etc.) was selected based on the literature analysis of the involvement of genes up- and down-regulated in solid and trabecular structures in cancer invasion and a heterogeneity in expression of their proteins in breast tumors. The association of these proteins with patients' survival was assessed.*

Введение. Инвазия – один из признаков опухолевого роста, проявляющийся в миграции клеток опухоли из первичного очага в соседние ткани. Инвазия является первым этапом в процессе метастазирования онкологических заболеваний [1]. Понимание молекулярных основ движения опухолевых клеток представляет актуальную задачу в современной онкологии [2]. Несмотря на обилие литературных данных по этой проблеме, в настоящее время отсутствуют эффективные маркеры, указывающие на то, двигается ли опухолевая клетка или находится в состоянии покоя.

Ранее нашим коллективом была описана внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы (РМЖ), представленная наличием различных видов структур: альвеолярных, солидных, тубулярных, трабекулярных и дискретных [3,4]. Собственные данные указывают на то, что данные структуры являются отражением различных вариантов инвазивного роста и играют значительную роль в метастазировании РМЖ. Например, трабекулярные структуры имеют выраженный мезенхимальный фенотип, демонстрируют значительную регуляцию сигнальных путей, вовлеченных в инвазию, и ассоциированы с высоким риском гематогенного метастазирования РМЖ [5]. Всё это позволило нам заключить, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность РМЖ представляет привлекательную модель для поиска новых маркеров опухолевой инвазии.

Таким образом, целью настоящего исследования было поиск маркеров инвазивного роста РМЖ и оценка их связи с прогнозом заболевания.

Материалы и методы. В работе использовались собственные данные полнотранскриптомного профилирования (GEO, GSE80754) различных морфологических структур трёх случаев РМЖ (средний возраст – 45 лет, степень злокачественности – 2, T₂N₀₋₂M₀). Данные микроматричного анализа подвергались биоинформатической обработке в среде R с помощью программного пакета limma. Были отобраны гены, дифференциально экспрессирующиеся в структурах по сравнению с нормальным эпителием молочной железы, и гены, дифференциально экспрессирующиеся между структурами без поправки на норму. Обязательным условием была статистически значимая гипер- и/или гипокспрессия (p<0,05). Затем был произведен анализ гипер- и гипокспрессирующихся генов в каждом типе морфологических структур на предмет их связи с инвазией и метастазированием. Была сформирована панель генов опухолевой инвазии, специфичных для морфологических структур, в частности для солидных и трабекулярных структур, показывающих выраженные инвазивные характеристики как варианты коллективной миграции опухолевых клеток. Белки, кодируемые данными генами, оценивались в базе данных Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>) на предмет их избирательной экспрессии в солидных и трабекулярных структурах, проявляющейся в маркировке периферии или концов (инвазивный фронт) данных структур. Оценка связи экспрессии белков с выживаемостью больных РМЖ проводилась с использованием ресурса Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com>)

Результаты. На основании анализа гипо- и гиперэкспрессирующихся генов солидных и трабекулярных структур был составлен список маркеров, которые представляют потенциальный интерес в плане их маркировки коллективной инвазии и инвазивного фронта опухоли молочной железы. Кроме того, выбраны гены, экспрессирующиеся одновременно в солидных и трабекулярных структурах. На основании проведенного анализа особенностей экспрессии белков, кодируемых выбранными генами, в опухолях молочной железы, было выбрано девять белков (KIF14, DSC3, WAVE и др.), гетерогенно/избирательно экспрессирующихся как в пределах опухоли, так и в пределах солидных и трабекулярных структур. Так, согласно базе данных Human Protein Atlas KIF14 и DSC3 гиперэкспрессировались (Рис. 1А), а экспрессия WAVE терялась на периферии и концах данных структур.

Была исследована ассоциация экспрессии этих белков с безрецидивной и метастатической выживаемостью пациентов с РМЖ. На основании результатов Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com>) ассоциированными с безрецидивной выживаемостью были белки KIF14, DSC3 и WAVE (Рис. 1Б). При этом для белков KIF14 и DSC3 с плохой выживаемостью была ассоциирована высокая экспрессия, тогда как для белка WAVE – низкая экспрессия. Кроме того, высокая экспрессия KIF14 и низкая экспрессия WAVE были также ассоциированы с плохой безметастатической выживаемостью. Подобные результаты были получены для других белков опухолевой инвазии.

Заключение. Были найдены новые молекулярные маркеры инвазивного фронта рака молочной железы и показана связь их экспрессии с выживаемостью и клиническим прогнозом заболевания.

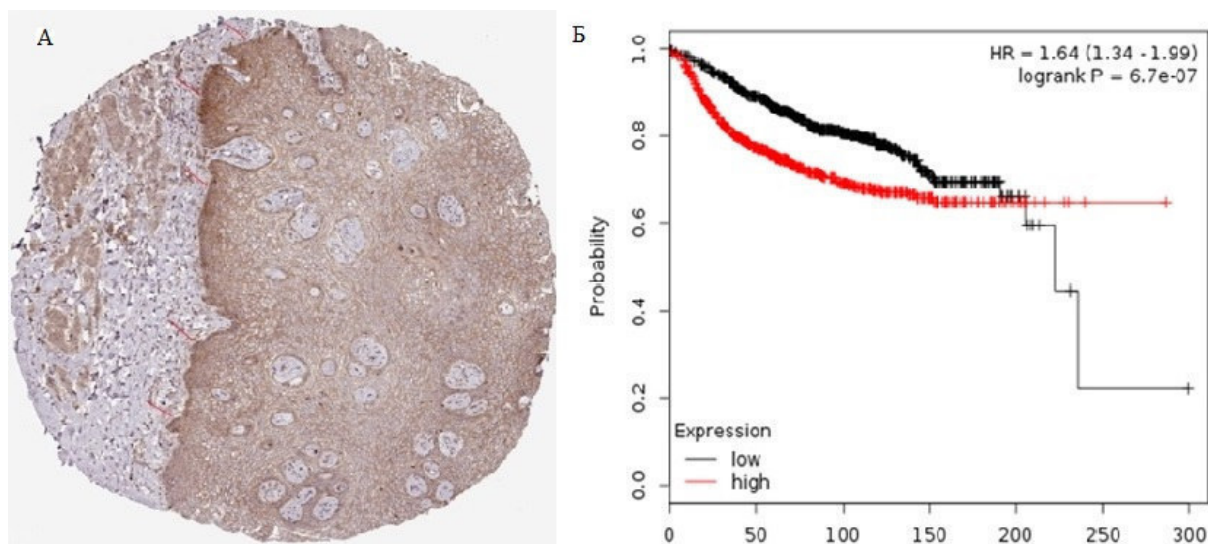


Рис. 1. А – Гиперэкспрессия белка KIF14 по периферии солидной структуры (*The Human Protein Atlas*, <https://www.proteinatlas.org>); Б – Ассоциация экспрессии KIF14 в опухолевой ткани молочной железы с безрецидивной (справа) выживаемостью больных РМЖ (Kaplan-Meier Plotter, <http://kmplot.com>).

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-15-00318).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Friedl, P., Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, no. 3, pp. 362-374.
2. Крахмаль Н.В., Завьялова М.В., Денисов Е.В., Вторушин С.В., Перельмутер В.М. Инвазия опухолевых эпителиальных клеток: механизмы и проявления // *Acta Naturae*. – 2015. – Т. 7 – №2. – С.18-30.
3. Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Гарбуков Е.Ю., Глущенко С.А. Сопряженность лимфогенного метастазирования и гистологического строения инфильтративного компонента протокового рака молочной железы // *Сибирский онкологический журнал*. – 2006. – № 1. – С. 32-35.
4. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Гарбуков Е.Ю. Особенности гематогенного метастазирования при раке молочной железы в зависимости от гистологического строения опухоли // *Сибирский онкологический журнал*. – 2006. – № 3. – С. 29-33.
5. Denisov, E.V., Skryabin, N.A., Gerashchenko, T.S., Tashireva, L.A., Wilhelm, J., Buldakov, M.A., Sleptcov, A.A., Lebedev, I.N., Vtorushin, S.V., Zavyalova, M.V., Cherdyntseva, N.V., Perelmuter, V.M. (2017). Clinically relevant morphological structures in breast cancer represent transcriptionally distinct tumor cell populations with varied degrees of epithelial-mesenchymal transition and CD44+CD24-stemness. *Oncotarget*, no. 8, pp. 61163–61180.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА DIOL В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Э. А. Пашковская

Научный руководитель: профессор, д.х.н. А. А. Бакибаев

Научный консультант: заведующий лаб. аналитической химии Отдела фармакологических разработок
ООО «ИФАР» А. Е. Квач

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36.

E-mail: elvirapashkovskaya@gmail.com

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HPLC METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ACTIVE SUBSTANCE DIOL IN DOSAGE FORM

E. A. Pashkovskaya

Scientific Supervisor: Prof., PhD A. A. Bakibaev

Scientific consultant: head of the laboratory of Analytical Chemistry, Department of Pharmacological Development, "IFAR", A. E. Kwach

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: elvirapashkovskaya@gmail.com

***Abstract.** In this work was studied the substance DIOL, which has a therapeutic effect against the symptoms of Parkinson's disease (in preclinical studies were conducted at the Institute of Organic Chemistry in Novosibirsk). In the course of the study conditions were chosen for quantifying the substance of DIOL in the dosage form. The result of the work is the developed procedure for determining the DIOL by HPLC, which corresponds to all parameters considered in the validation process.*

Введение. На сегодняшний день одним из заболеваний, трудно поддающихся лечению, является болезнь Паркинсона. Ее проявления (мышечная ригидность, гипокинезия, тремор, постуральная неустойчивость) купируются с помощью комплексной терапии препаратами, одним из которых является Леводопе. Кроме побочных эффектов (тошнота, головная боль, головокружение, аритмия и пр.) недостатком данного препарата является его высокая стоимость, что заставляет задуматься о разработке более доступного для пациентов аналога Леводопе, способного улучшить качество жизни больных с диагнозом паркинсонизм. Разработать препарат, который можно использовать при такой терапии, возможно на основе запатентованной Новосибирским институтом органической химии (НИОХ) молекулы 3-МЕТИЛ-6-(1-МЕТИЛ-ЭТЕНИЛ)ЦИКЛОГЕКС-3-ЕН-1,2-ДИОЛА, синтезируемой из альфа-пинена, основного компонента скипидара. Доклинические исследования, проведенные в НИОХ *in vivo*, показали терапевтическую эффективность данного агента против искусственно вызванных симптомов болезни Паркинсона, а длительный 30-дневный эксперимент - отсутствие токсического воздействия на жизненно важные органы животных [1]. Одним из этапов, предшествующих выпуску препарата, является разработка аналитической методики количественного определения действующего вещества DIOL в лекарственной форме

(ЛФ) методом ВЭЖХ и экспериментальное доказательство ее пригодности. Это и является целью данной работы. В ходе работы необходимо решить следующие задачи: подобрать компоненты подвижной фазы и их оптимальное соотношение; разработать методику приготовления испытуемого раствора и раствора сравнения; экспериментально подобрать оптимальные условия хроматографического анализа; определить метрологические характеристики разработанной методики для подтверждения ее соответствия фармакопейным требованиям.

Материалы и методы исследования. Материалы. Раствор 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ), раствор ацетонитрила, испытуемый раствор DIOL и раствор сравнения.

Экспериментальная часть. В первую очередь была выбрана оптимальная длина волны для определения DIOL детектором хроматографа. При прочих равных условиях были записаны две хроматограммы испытуемого раствора DIOL при двух разных длинах волн: 200 и 210 нм. На полученной хроматограмме (рис.1) видно, что эффективность хроматографирования разная: высота пика, полученного при записи хроматограммы при 200 нм значительно выше пика DIOL, детектированного при 210 нм.

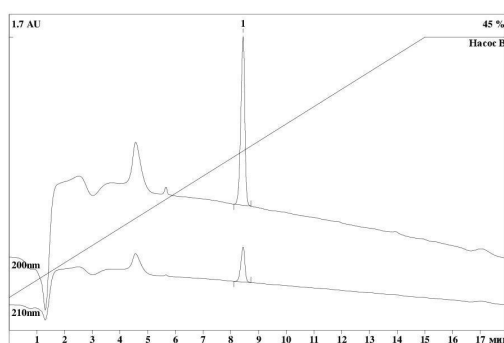


Рис.1. Хроматограммы, записанные для испытуемого раствора DIOL при разных длинах волн

На основании литературных данных было предложено использовать в качестве компонентов ПФ ТФУ и ацетонитрил. Хроматограммы, записанные в двух разных режимах: градиентном и изотоническом, - показывают неэффективность изотонического режима: в данном случае происходит недостаточное разделение пиков (рис.2), т.к. по нормативным требованиям разрешение между пиками DIOL и ближайшей примеси должно быть не менее 2,0. Этому требованию удовлетворяет градиентный режим (рис.3), при котором доля ПФ Б изменяется от 5 до 45%.

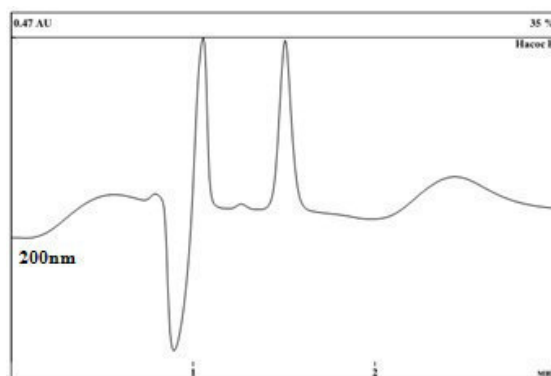


Рис.2. Хроматограмма, записанная для испытуемого раствора DIOL в изотоническом режиме

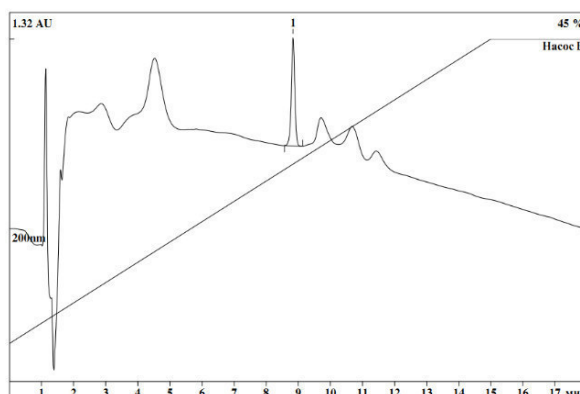


Рис.3. Хроматограмма, записанная для испытуемого раствора DIOI в градиентном режиме

Результаты. В результате работы была разработана методика количественного определения DIOI в ЛФ на хроматографе «Милихром А-02» (с УФ-детектором). Оптимальным был принят состав подвижной фазы (ПФ): ПФ А – 0,1% ТФУ, ПФ Б – ацетонитрил; колонка - ProntoSIL размером 75 x 2,0 мм, заполненная сферическими частицами силикагеля, поверхность которых ковалентно модифицирована октадецильными группами и эндкепированна, с размером частиц 5,0 мкм и диаметром пор 120 А (ООО «ЭкоНова», г.Новосибирск); режим элюирования – градиентный:

Таблица 1

Параметры градиентного режима элюирования для методики количественного определения DIOI в ЛФ

Время, мин	Доля ПФ А, %	Доля ПФ Б, %
0-2	95	5
2-15	95→55	5→45
15-18	55	45

Скорость потока – 0,15 мл/мин; детектор – спектрофотометрический, 200 нм; объём пробы – 5 мкл; температура колонки - 35°C. Кроме того была проведена валидация методики по следующим параметрам: специфичность; линейность; правильность; прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная прецизионность).

Заключение. Итогом работы является разработанная аналитическая методика количественного определения действующего вещества DIOI в лекарственной форме методом, пригодность которой была экспериментально доказана в процессе валидации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент № 2418577 РФ МПК А61К31/015 А61К31/047 А61Р25/16 Средство для лечения болезни Паркинсона / Т. Г. Толстикова, А.В. Павлова, Е.А.Морозова, И.В.Ильина, О.В.Ардатов, К.П.Волчо, Н.Ф.Салахутдинов. Заявл. 24.12.2009; Оpubл. 20.05.2011, Бюл. № 6. - 5 с.: ил.

**ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ИПМИ В
СОЧЕТАННОМ ДЕЙСТВИИ С ДОКСОРУБИЦИНОМ IN VITRO**Е. А. Просекина

Научный руководитель: к.б.н., с.н.с. М.А. Булдаков

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: elizaveta.prosekina@gmail.com**ANTITUMOR THERAPY EFFICIENCY OF DIFFERENT TYPES OF NANOSECOND PULSE-
PERIODIC MICROWAVE RADIATION IN COMBINATION WITH DOXORUBICIN IN VITRO**E. A. Prosekina

Scientific supervisor: PhD. M. A. Buldakov

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: elizaveta.prosekina@gmail.com

Abstract. It is known that the action of high-amplitude electric pulses can significantly increase the permeability of cell membranes due to the formation of pores in them (electroporation). The aim of this research was to study the possibility of forming electropores in membranes of tumor cells by means of a non-invasive method using nanosecond microwave pulses for effective delivery of chemotherapeutic agents to the cell. The HeLa cell line was used as a model object. Doxorubicin was used as a chemotherapeutic drug in various concentrations: 0.5, 1.0 and 2.5 μM . Radiation was carried out on two sources of pulsed-periodic microwave radiation, characterized by different parameters. It was found that, 24 hours after exposure at pulse repetition rates of 13 and 16 Hz in combination with doxorubicin, there was an increase in inhibition of tumor cell proliferation by 30 and 40 %, respectively.

Введение. В последние годы активно изучается устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим агентам [1]. Выявлен феномен «ускользания» опухолевой клетки из-под действия химиопрепарата, так называемая множественная лекарственная устойчивость. В ряде работ показано, что воздействие высокоамплитудными электрическими импульсами способно значительно увеличивать проницаемость мембран клеток за счёт образования в них пор (электропорация) [2]. Увеличение проницаемости клеточных мембран, позволяет увеличивать количество доставляемых химиопрепаратов в клетку. Помимо этого известно, что воздействия микроволновых излучений в импульсном режиме (ИПМИ), когда частоты повторения импульсов не превышают 30 Гц, вызывает биологические эффекты, значительно отличающиеся от неимпульсных [3].

Также в последние годы внимание исследователей привлекают эффекты, вызываемые импульсно-периодическим высокочастотным излучением (ИПВЧ) в биологических объектах. В частности, было показано, что воздействие ИПВЧ может приводить изменению структуры митохондриальной мембраны, нарушению целостности её липидного матрикса и открытию МРТ-пор, которые играют роль пускового фактора апоптоза [4]. До сих пор остаются неясными механизмы влияния ИПВЧ на нормальные и опухолевые клетки. В этом плане становится важным изучение возможности формирования электропор

в мембранах опухолевых клеток неинвазивным методом с помощью наносекундных микроволновых импульсов для эффективной доставки химиопрепарата в клетку.

Материалы и методы. В качестве модельного объекта использовалась клеточная линия *HeLa*. Клетки культивировались в пластиковых чашках Петри по стандартной технологии, процедуру облучения осуществляли в пластиковых пробирках. В качестве химиопрепарата, обладающего цитостатическим действием, использовали доксорубин в различных концентрациях: 0,5, 1,0 и 2,5 мкМ.

Облучение проводили на двух источниках:

1) Источник импульсно-периодического микроволнового излучения – лабораторный генератор на основе магнетрона «МИ-505», разработанный и изготовленный в Институте сильноточной электроники СО РАН (Томск). Клетки подвергались воздействию ИПМИ с несущей частотой 10 ГГц, длительностью импульсов 70 нс, частотой повторения импульсов 10, 13, 16 Гц и пиковой плотностью потока мощности (пППМ) 1500 Вт/см². Время облучения ограничивалось количеством импульсов (4000 импульсов за сеанс).

2) Источник наносекундных высокочастотных и униполярных импульсов электрического поля (ИПВЧ). Амплитуда импульсов составляла 36 кВ/см, несущая частота от 0,6 до 1,0 ГГц, длительность 25 нс, частота повторения импульсов 13 Гц. Количество импульсов за сеанс ограничивалось от 1000 имп. до 4000 имп. в различных сочетаниях. Пробирки с клеточной суспензией помещались в центр волновода, где амплитуда электрического поля имеет максимальное значение. Контрольные клетки подвергались всем тем же процедурам, что и экспериментальные, за исключением фактора облучения.

Оценку пролиферативной активности и выживаемости клеток на первые сутки проводили с помощью МТТ-теста. Метод заключается в способности живых клеток превращать растворимый желтый бромид (МТТ) в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формазана (МТТ-ф). Нежизнеспособные мёртвые клетки такой способностью не обладают. Оптическую плотность клеточной суспензии измеряли на планшетном спектрофотометре Thermo Scientific (США) на длине волны 620 нм.

Все показатели анализировались в зависимости от параметров излучения (частоты повторения импульсов, количества воздействующих импульсов и напряженности электрического поля). Статистическая значимость различия между показателями облученных и контрольных клеток оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты. Пролиферативная активность клеток в разных экспериментах была различной. Эффект воздействия зависел от частоты повторения импульсов, а также от сочетанного воздействия ИПМИ и доксорубина.

После воздействия излучением с частотой повторения импульсов 13 Гц наблюдается снижение пролиферативной активности на 30% по сравнению с контролем. При этом эффект усиливается при сочетанном воздействии с доксорубином с концентрациями 1 и 2,5 мкМ

После облучении с частотой повторения импульсов 16 Гц был найден наиболее выраженный эффект ингибирования клеточной пролиферации – около 40%. Увеличение концентрации ДР в культуре клеток приводит к еще более выраженному торможению клеточного роста. При этом эффект отмечается даже при использовании самой маленькой концентрации ДР – 0,5 мкМ, чего не наблюдалось при использовании других частот.

При использовании ИПВЧ эффекта усиления ингибиции клеточной пролиферации не было обнаружено, что свидетельствует о поиске новых режимов для этого вида излучения.

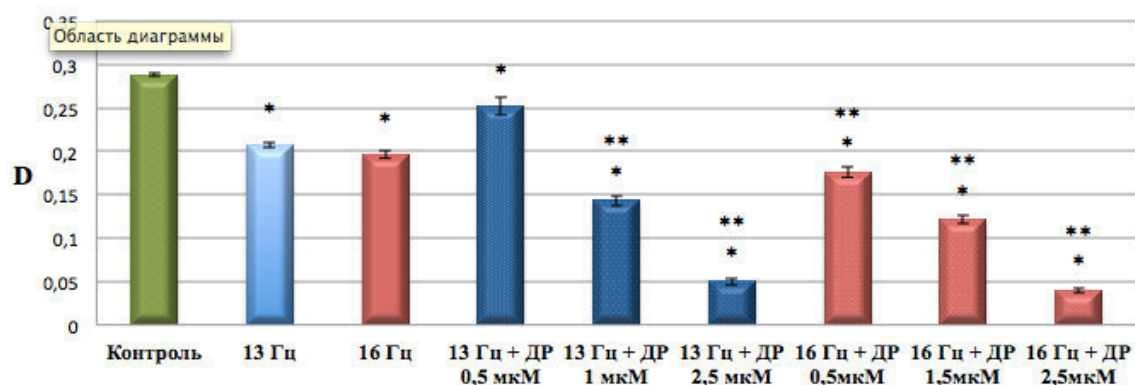


Рис. 1. Сочетанное действие наносекундных импульсных микроволн на пролиферативную активность опухолевых клеток. Примечание: D – оптическая плотность; ДР – доксорубицин (концентрация в микромолях); * – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»; ** – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с группами облучения ИПМИ с частотами 13 и 16 Гц, соответственно

Заключение. Исходя из имеющихся литературных данных, можно предположить, что одним из возможных механизмов усиления цитостатического действия доксорубицина на опухолевые клетки посредством ИПМИ может являться способность наносекундных микроволновых импульсов в зависимости от частот повторения индуцировать процесс электропорации. Образующиеся электропоры, по-видимому, должны увеличивать поступление доксорубицина в опухолевые клетки, что, в свою очередь, оказывает более пролонгированное действие в отношении молекул ДНК, являющиеся мишенью для доксорубицина. Полученные результаты открывают перспективу для дальнейшего экспериментального исследования способности ИПМИ усиливать пролонгированное действие доксорубицина на опухолевые клетки. А это, в свою очередь, может быть использовано для разработки новой инновационной технологии неинвазивной низкодозовой лучевой терапии злокачественных новообразований, повышающей эффективность лекарственной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блохин Д. Ю. Механизмы формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Клиническая онкогематология. – 2009. – № 1. – С. 167-175.
2. Pakhomov A. G. et al. (2007). Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks. Archives of Biochemistry and Biophysics, no. 1, pp. 109-118.
3. Литвяков Н.В. с соавт. Влияние импульсно-периодического СВЧ-излучения на синтез нуклеиновых кислот в опухолевых клетках // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2005. - № 4. – С. 491-494.
4. Zharkova L. et al. (2017) Mitochondrial respiration inhibition after exposure to UWB pulses as a possible mechanism of antitumor action. IOP Conf. Series: Journal of Physics, no. 830, pp.1-4.

**МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ С ПОМОЩЬЮ
МИКРОДУГОВОГО ОКСИДИРОВАНИЯ В ПРИСУТСТВИИ РАСТВОРОВ ПОЛИМЕРОВ.
ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА**

А.А. Ракина^{1,2,3}

Научный руководитель: профессор, д.м.н. Е.Г. Чурина^{1,2}, доцент, к. ф.-м. наук С.И. Твердохлебов³

²Сибирский государственный медицинский университет,

³Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: aar37@tpu.ru

**MODIFICATION OF TITANIUM IMPLANTS SURFACE BY MICROARC OXIDATION IN
PRESENCE OF POLYMERIC SOLUTIONS. THE STUDY OF IMMUNE RESPONSE**

A.A. Rakina¹

Scientific Supervisor: Prof., Dr. E.G. Churina², PhD, S.I.Tverdokhlebov³

²Siberian State Medical University

³Tomsk Polytechnic University

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: aar37@tpu.ru

Abstract. *In the present study, we performed the in vitro evaluation of titanium samples with four types of coatings obtained by microarc oxidation (MAO): pure calcium phosphate (CaP), CaP- chitosan, CaP- hyaluronic acid, CaP - polyvinylpyrrolidone coatings. AlamarBlue test and TNF α secretion analysis (ELISA) were performed to investigate the immune response. It was shown that formation of MAO hybrid calcium-phosphate coatings increases the biocompatibility of samples. Adding of polyvinylpyrrolidone and hyaluronic acid to the electrolyte solution presumably makes it possible to obtain hybrid coatings with anti-inflammatory properties.*

Введение. Основной клинической проблемой при применении имплантируемых материалов является хроническое воспаление. Ключевыми клетками, которые способны как простимулировать, так и подавить воспалительные реакции в условиях микроокружения имплантата являются тканевые макрофаги [1].

Активация тканевых макрофагов и осуществляемые ими в дальнейшем иммунологические функции определяются локальным иммунным статусом микроокружения клеток и происходят в двух основных направлениях: по классическому пути активации (M1-активация), по альтернативному пути активации (M2-активация) [2]. M1-активация вызывает каскад иммунологических реакций, приводящих к развитию воспаления и повреждению тканей и сопровождающихся усиленной секрецией провоспалительных цитокинов. M2-активация, напротив, обусловлена макрофагами второго типа, биологическая роль которых состоит в регуляции интенсивности иммунного ответа, в том числе путем

секреции противовоспалительных цитокинов и приводит к усилению ангиогенеза с последующей репарацией тканей [3].

Для оценки иммунного ответа на разрабатываемые материалы, в данной работе исследовали влияние гибридных кальций-фосфатных покрытий (КАП), полученных методом микродугового оксидирования, на жизнеспособность первичных человеческих макрофагов, а также на секрецию ими провоспалительного цитокина TNF- α .

Материалы и методы. Выделение и культивирование CD14⁺ моноцитов. Первичные макрофаги человека были выделены из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы трех индивидуальных здоровых доноров. CD14⁺ моноциты выделяли методом магнитной сепарации на двойном градиенте фикола различной плотности с помощью магнитных бидсов, конъюгированных с антителами к рецептору CD14⁺ (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Германия). Количество выделенных моноцитов определяли на счетчике клеток CASY® Model TT (Roche Innovatis AG, Германия). В качестве контроля культивировали моноциты без исследуемых материалов. Выделенные моноциты были сразу же простимулированы цитокинами: IL4 – 10 нг/мл (Peprotech, Германия), IFN γ – 100 нг/мл (Peprotech, Германия) и культивировались в течение 6 дней в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C.

Исследование жизнеспособности моноцитов. Жизнеспособность M0, M1 и M2 человеческих макрофагов на 6 день кокультивирования с исследуемыми материалами исследовали с использованием флуоресцирующего красителя Alamar blue (Sigma, США). Полученные значения жизнеспособности нормировали на контроль, результаты представлены в относительных единицах (%).

Иммуноферментный анализ (ИФА). Для определения концентрации TNF- α отбирали супернатанты по окончании культивирования клеток на 6 день эксперимента. Определение концентрации TNF- α (R&D Systems, США), проводилось с помощью сэндвич-ИФА согласно инструкции производителя.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования жизнеспособности M0-макрофагов, кокультивированных с исследуемыми материалами, представлены на рис. 1.

Нанесение КАП на титановую подложку способствует увеличению жизнеспособности M0 человеческих макрофагов (относительная жизнеспособность клеток больше, чем в контроле (>100%)) (Рис.1). Жизнеспособность M1 макрофагов, кокультивированных с материалами, ниже, чем в контрольной культуре (<100%).

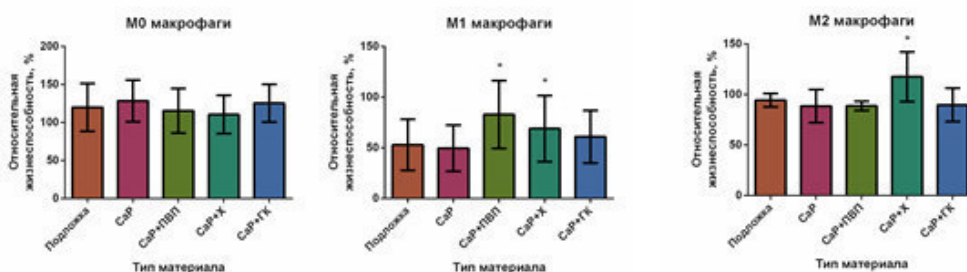


Рис. 1. Результаты исследования жизнеспособности M0, M1 и M2 макрофагов, кокультивированных с исследуемыми материалами: CaP – КАП, (КАП) CaP+ПВП – КАП с добавлением поливинилпирролидона, CaP+X – Кап с добавлением хитозана, CaP+ГА – КАП с добавлением гиалуроновой кислоты, * – $p < 0,05$ по сравнению с подложкой

При этом, нанесение на подложку КАП, полученных с добавлением поливинилпирролидона и хитозана в раствор электролита, способствует достоверному увеличению жизнеспособности M1 макрофагов по сравнению с другими материалами. Кокультивирование M2 макрофагов с исследуемыми материалами не влияет на их жизнеспособность, за исключением материала с покрытием из КАП с добавлением хитозана, где жизнеспособность M2 макрофагов достоверно выше. Таким образом, нанесение гибридных КАП способствует увеличению биосовместимости материалов.

Наблюдаемые реакции первичных макрофагов человека являются донор-специфичными (Рис.2). Среди 3 доноров один (BC-1021-6, показан зеленым на Рис.2) имеет выраженные воспалительные реакции на все исследуемые типы материалов. Присутствие материалов не стимулирует секрецию TNF- α M2-макрофагами двух других доноров. У этих же доноров наблюдается снижение секреции TNF- α при кокультивировании M0 и M1 макрофагов с материалами, покрытыми КАП с добавлением поливинилпирролидона и гиалуроновой кислоты, и увеличение секреции TNF- α при совместном культивировании M0 и M1 макрофагов с материалами, покрытыми КАП с добавлением хитозана (по сравнению с подложкой).

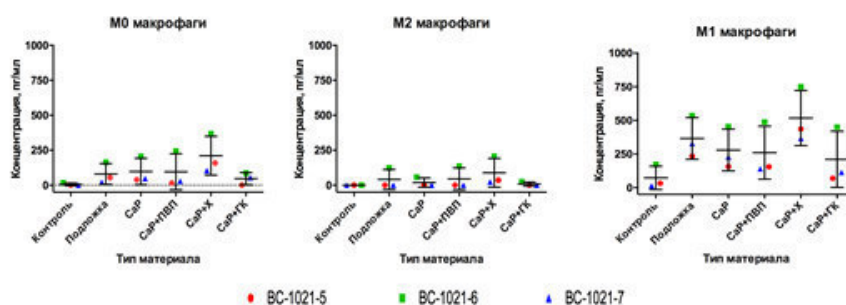


Рис. 2. Концентрация TNF- α на 6 день совместного культивирования первичных человеческих макрофагов с исследуемыми материалами, измеренная методом ИФА. BC – обозначение номера индивидуального донора

Таким образом, КАП с добавлением поливинилпирролидона и гиалуроновой кислоты обладают противовоспалительными свойствами.

Выводы. Нанесение гибридных кальций-фосфатных покрытий, полученных методом микродугового оксидирования, увеличивает биосовместимость материалов. Добавление в раствор электролита поливинилпирролидона и гиалуроновой кислоты позволяет получать гибридные покрытия с противовоспалительными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murray P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines // Immunity. – 2014. – Т. 41. – №. 1. – С. 14-20.
2. Sridharan R. et al. Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles // Materials Today. – 2015. – Т. 18. – №. 6. – С. 313-325.
3. Baugh J. A., Bucala R. Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease // Current opinion in drug discovery & development. – 2001. – Т. 4. – №. 5. – С. 635-650.

**МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И ТЕРМОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПОДКОЖНОЙ БЕЛОЙ ЖИРОВОЙ
ТКАНИ ПРИРОДНЫХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ**

К.И. Расторгуева, Н.А. Гурков

Научный руководитель: доцент, к.б.н. Е.И. Елсукова

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева»,

Россия, г. Красноярск, ул. Ады Лебедевой, 89, 660049

E-mail: kseiyara95@gmail.com

**METABOLIC AND THERMOGENIC PROPERTIES OF THE SUBCUTANEOUS WHITE ADIPOSE
TISSUE OF WILD AND LABORATORY RODENTS**

K.I. Rastorgueva, N.A. Gurkov

Scientific Supervisor: assistant professor, Ph.D. of Biological Sciences E.I. Elsukova

Krasnoyarsk State Pedagogical University named after V. P. Astafev,

Russia, Krasnoyarsk, Lebedeva str., 89, 660049

E-mail: kseiyara95@gmail.com

***Abstract.** For the first time biochemical analysis of inguinal adipose tissue of korean mouse (*Apodemus peninsulae*) and short-tailed vole (*Microtus agrestis*) have performed. Expression of uncoupling protein UCP1 in inguinal fat was combined with high metabolic and oxidative activity of this fat depot in wild rodents, in comparison with laboratory mice. Studies of the adipose tissues in animals from natural populations can be useful for the elucidating of the physiological norm of their functioning and for the development of regimes for the prevention and correction of metabolic disorders.*

Введение. Прошедшие два десятилетия кардинально изменили представления о физиологии жировой ткани [1]. Она все чаще предстает как структура, филогенетическое становление которой предопределило эволюцию гомойотермии у млекопитающих [2]. Депонирование энергии в белой жировой ткани было условием надежного функционирования организма на всех этапах антропогенеза и на протяжении большей части истории человечества. Термонеutralная среда, доступное, энергоемкое питание привели к функциональной перегрузке энергетических депо жировой ткани, прогрессивному росту абдоминального ожирения и связанных метаболических нарушений [1, 3]. Имитация этих условий в экспериментах на лабораторных грызунах раскрывает этапы и механизмы дистрофических изменений жировых тканей и их ключевую роль в патогенезе метаболического синдрома. Другим перспективным подходом к выяснению «нормального», т.е. эволюционно закрепленного функционирования жировых тканей и на этой основе разработке режимов профилактики и коррекции метаболических нарушений у человека, могут стать исследования свойств жировых тканей у животных из природных популяций [4, 5]. На сегодняшний день сведения о состоянии жировых депо у природных животных немногочисленны и не выходят за рамки анатомо-морфологических описаний. Целью работы был сравнительный анализ метаболических и термогенных свойств подкожной белой жировой ткани природных и лабораторных грызунов.

Материалы и методы исследования. Природные объекты исследований - половозрелые самцы темной полевки (*Microtus agrestis*) и восточно-азиатской лесной мыши (*Apodemus peninsulae*), отловленные в июне - июле в окрестностях г. Красноярска. Самцы мышей *ICR* получены из питомника ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирск). При проведении исследований руководствовались Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986). Подкожную белую жировую ткань выделяли из пахового депо после декапитации животных. Ее метаболическую и окислительную активность оценивали по содержанию воды, общих фракций РНК, ДНК и белка в тканевых гомогенатах, приготовленных на 0,01 М Трис-НСl с 1 мМ ЭДТА, рН 7,2. ДНК и РНК определяли по результатам спектрофотометрии при 270 и 290 нм тканевых гидролизатов [6], содержание воды определяли, высушивая кусочки ткани до постоянного веса при 105 °С, белок определяли по методу Лоури. Термогенный потенциал жировых тканей оценивали по присутствию разобщающего белка UCP1, который в паховом жире маркирует популяцию термогенных бежевых адипоцитов [1, 2, 7, 8]. Белок UCP1 идентифицировали с помощью вестерн-блоттинга [8]. На гель наносили по 80 мкг белка, электроперенос белка на нитроцеллюлозу (0,2 мкм) проводили полусухим способом. Для выявления полосы UCP1 использовали препараты антител компании Sigma Aldrich (USA), нагрузочные контроли отсутствовали. Титр первичных и вторичных антител составил 1:500. Всего в каждой группе животных вестерн-блоттинг проводили с 3-5 пробами пахового жира. Интенсивность полосы UCP1 оценивали с помощью программы «GelAnalyzer». Все показатели представлены в виде средних и их статистических ошибок. Различия между группами животных оценивали с помощью критерия наименьшей значимой разницы (LSD) в программе «Statistica 6» StatSoft.

Результаты. У всех отловленных грызунов наблюдались выраженная редукция подкожного и абдоминального жировых депо (табл. 1), темные розово-буроватые оттенки цвета (browning) – особенность морфологии жировых тканей, отражающая активный митохондриогенез в них [7].

Таблица 1

Биохимические показатели паховой жировой ткани лабораторных мышей
и свободно обитающих грызунов

№	Животные	Масса, %	ДНК, мкг/мг	РНК, мкг/мг	Общий белок, мкг/мг	Белок UCP1, у.е./мкг белка	Вода, мкг/мг
1	Лабораторные мыши <i>ICR</i> , n=10	1,41±0,14	0,21±0,04 ²	0,22±0,03	11,22±0,19	18,68 (2)	110,0±9,8
2	Восточноазиатская мышь, n=7	0,27±0,04 ¹	0,54±0,05 ^{1,3}	0,40±0,04 ¹	60,49±6,46 ^{1,3}	29,45±5,86 (3)	320,7±30,7 ¹
3	Темная полевка, n=6	0,27±0,05 ¹	0,23±0,04 ²	0,29±0,05	25,13±6,05 ^{1,2}	21,27±2,88 (3)	220,5±30,1 ¹

Примечание: Масса пахового депо выражена в % по отношению к массе тела. Верхние индексы указывают номера группы животных, с показателем которых имеется статистически значимое различие, $p < 0,05$. При расчете интенсивности полосы UCP1 учитывались только блоты, где идентифицировалась полоса этого белка; их количество указано в круглых скобках.

Содержание воды, РНК и белка в пробах пахового жира у природных грызунов было существенно выше по сравнению с лабораторными мышами (табл. 1). Особенно высокие значения этих показателей в сочетании с двукратным увеличением содержания ДНК регистрировались у лесной мыши. Разобщающий белок UCP1 идентифицировали примерно с одинаковой частотой в пробах пахового жира во всех группах животных, интенсивность полосы UCP1 не различалась между группами.

Заключение. В результате проведенного комплексного исследования впервые получены данные о массе, основных биохимических показателях белой жировой ткани мышевидных грызунов из природных популяций. Особый интерес представляет идентификация белка UCP1, который в белом жире маркирует недавно открытый у лабораторных грызунов и у человека новый тип жировых клеток – бежевые адипоциты [1, 7], функции которых окончательно не установлены. Впервые полученные нами данные о присутствии UCP1 в паховом депо свободно обитающих грызунов свидетельствуют, что бежевые адипоциты – не лабораторный артефакт, а нормальный компонент тканевого комплекса белой жировой ткани. Сравнительный анализ полученных данных показывает, что присутствие UCP1-позитивных клеток не обязательно коррелирует с окислительной активностью жировых депо. Для свободно обитающих грызунов по сравнению с аутбредными лабораторными мышами характерна высокая метаболическая и окислительная активность пахового жира. Изучение природных факторов, стимулирующих бежевый адипогенез в жировых депо, представляет несомненный интерес для разработки стратегий профилактики и лечения метаболического синдрома.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosen E.D., Spiegelman B.M. (2014). What we talk about when we talk about fat?. Cell, vol. 156, pp. 20-44.
2. Li Y., Lasar D., Fromme T., Klingenspor M. (2014). White, brite, and brown adipocytes: the evolution and heater organ in mammals. Journal of Canadian J. Zoology, vol. 92, no 6. pp. 615-626.
3. Bartelt A., Heeren J. (2014). Adipose tissue browning, metabolic health. Nat Rev Endocrinol, vol. 10, no 1, pp. 24-36.
4. Wang Y., Zhu T., Ke S., Fang N., Irwin D., Lei M., Zhang J., Shi H., Zhang S., Wang Z. (2014, November 13). The great roundleaf bat (*Hipposideros armiger*) as a good model for cold-induced browning of intra-abdominal white adipose tissue, no 9, Article 112495e, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4231071.html>.
5. Трудолюбова М.Г. Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 313–316.
6. Shabalina I.G., Petrovic N., de Jong J., Kalinovich A., Cannon B., Nedergaard J. (2013). UCP1 in Brite/Beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. Cell. Reports, vol. 5, no 5, pp. 1196-1203.
7. Elsukova E.I., Medvedev L.N., Mizonova O.V. (2016). Physiological features of perigonadal adipose tissue containing uncoupling protein UCP1 in ICR mice. Bull. Exp. Bio. Med, vol. 161, no 3, pp. 347-350.
8. Bai Z., Wuren T., Liu S., Han S., Chen L., McClain D., Ge R.L. (2015). Intermittent cold exposure results in visceral adipose tissue "browning" in the plateau pika (*Ochotona curzoniae*). Comp. Biochem. Physiol, vol.184A, pp.171-178.

**КОНТРОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА НА ОСНОВЕ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА
МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**

В.В. Романчук, В.Н. Небезин, Р.Т. Насибуллин

Научные руководители: В.С. Заседатель, д.ф.-м.н. Ю.В. Кистенев

Томский государственный университет, Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: flyingover@mail.ru

**CONTROL OF OXIDATIVE STRESS IN THE EXHALED AIR BY THE METHOD OF LASER
SPECTROSCOPY**

V.V. Romanchuk, V.N. Nevezhin, R.T. Nasibullin

Scientific Supervisors: V.S. Zasedatel, PhD U.V. Kistenev

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina Ave. 36, 634050

E-mail: flyingover@mail.ru

***Abstract.** In this study, exhaled air was analyzed for the presence of oxidative stress markers by laser spectroscopy. Oxidative stress was caused in subjects by physical activity. The absorption spectra of air samples were obtained and the corresponding markers were isolated.*

Введение. Оксидативный стресс – это нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса, сопровождающееся увеличением числа активных форм кислорода (АФК) и приводящее к апоптозу и окислению жизненно важных компонентов клетки, таких как липиды и ДНК. Оксидативный стресс может приводить к нарушению обмена веществ, быстрой утомляемости и головным болям, поражению внутренних органов, воспалительным процессам, а также развитию хронических и онкологических заболеваний [1, 2]. Для определения оксидативного стресса в диагностических целях используются различные маркеры – химические соединения или группы химических соединений, наличие которых при определенных концентрациях указывает на окислительные процессы. Маркеры оксидативного стресса регистрируются в пробах крови, мочи, слюны, испарений с кожи и пробах выдыхаемого воздуха (ПВВ). Основными такими маркерами являются этан, пентан и оксид азота (II) [3]. Выявление маркеров оксидативного стресса в выдыхаемом воздухе обладает рядом преимуществ: неинвазивность, простота отбора проб и отсутствие необходимости их дополнительной обработки. Таким образом, целью данного исследования являлась возможность выявления оксидативного стресса в организме испытуемых на основе анализа проб выдыхаемого воздуха методами лазерной спектроскопии.

Материалы и методы. Для проведения эксперимента была сформирована группа испытуемых из 5 человек в возрасте от 19 до 22 лет. Оценка однородности и состояния здоровья группы производилась на основе опросника SF-36. Способом активации оксидативного стресса была выбрана аэробная физическая нагрузка (бег). Преимуществами выбранного способа являются минимальный дискомфорт для испытуемых и контролируемость нагрузки, позволяющая варьировать в широком диапазоне параметры опыта. Также для участников был составлен ряд требований, исключающий прием некоторых продуктов питания, тонизирующих средств и групп препаратов. Опыт проводился в предварительно проветренном помещении с измерением следующих параметров: температуры, влажности, атмосферного

давления и уровня углекислого газа в помещении. Пробы выдыхаемого воздуха брались у испытуемых непосредственно перед физической нагрузкой, сразу после нагрузки и затем после небольшого отдыха (10-15 мин). Также бралась проба воздуха из помещения. В качестве пробоотборников выступали стандартные одноразовые шприцы Жане объемом 150 мл. Полученные пробы воздуха хранились в холодильнике при температуре + 4⁰С. Обработка проб производилась на лазерном газоанализаторе LaserBreeze в течении нескольких часов после забора.

Результаты. Были получены спектры поглощения проб воздуха в диапазоне 2900-3500 нм. Для разделения данных из полученных проб был использован метод главных компонент (principal component analysis, PCA). Пример проекции исследуемых спектров на подпространство первой, третьей и четвертой главных компонент (ГК) представлен на рисунке 1.

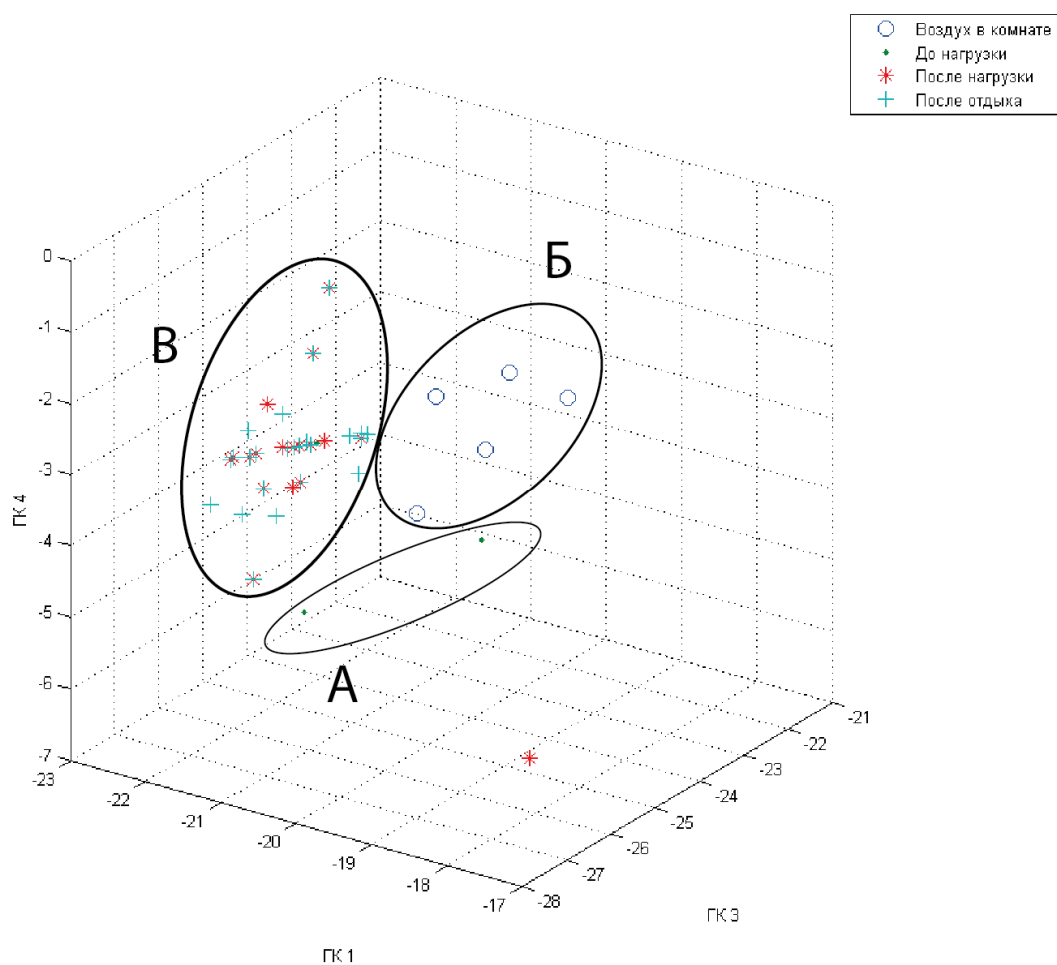


Рис. 1. Проекция исследуемых спектров на подпространство первой, третьей и четвертой главных компонент. А – группа для состояния «до нагрузки», Б – группа для проб воздуха из помещения, В – группа для состояний «после нагрузки» и «после отдыха»

Проведенный анализ позволил выделить 3 группы, соответствующих ППВ для состояния «до физической нагрузки» (рис. 1. А), пробам воздуха из помещения (рис. 1. Б) и для состояний «после физической нагрузки» и «после отдыха» (рис. 1. В). В последней группе неразделимость данных может быть связана с метаболической памятью организма, что приводит к присутствию тех же самых

метаболитов в пробах выдыхаемого воздуха в течение более длительного периода после прекращения эксперимента.

Заключение. Проведенное исследование показало, что предложенная методика может использоваться в качестве неинвазивного метода определения оксидативного стресса и применяться в различных методах диагностики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giustarini D., Dalle-Donne I., Tsikas D., Rossi R. (2009). Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, no. 46(5-6), pp. 241–281.
2. Buszewski B., Keszy M., Ligor T., Amann A. (2007). Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed. Chromatogr.*, no. 21, pp. 553–566.
3. Mazzatenta A., Giulio C.D., Pokorski M. (2013). Pathologies currently identified by exhaled biomarkers. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, no.187, pp. 128–134.

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТА ACONITUM BAIKALENSE STENB. НА РАЗВИТИЕ
ВОСПАЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ
ЭПИТЕЛИЯ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

О.Ю. Рыбалкина

Научный руководитель: профессор, д.м.н. Е.Г. Скурихин

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.

Гольдберга Томского Национального исследовательского медицинского центра,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634028

E-mail: olgatomsk87@gmail.com

**INFLUENCE OF THE EXTRACT ACONITUM BAIKALENSE STENB. ON INFLAMMATION
DEVELOPMENT AT BREAST EPITHELIUM TOXIC DAMAGE**

O.Yu. Rybalkina

Scientific supervisor: PhD, E.G. Skurichin,

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk NRMC,

Russia, Tomsk, Lenina Ave, 3, 634028

E-mail: olgatomsk87@gmail.com

Abstract. *There's considered the effect of extract A. baikalense Stenb on inflammation development at breast epithelium toxic damage It is shown that use MNU-induced inflammation with the extract of A. baikalense Stenb inhibition the development of inflammation and reduces cancer stem cells (CD44⁺CD24⁻).*

Введение. Воспаление – один из самых распространенных общебиологических процессов, лежащий в основе многих заболеваний. Главной целью противовоспалительной терапии является подавление активности уже существующего воспалительного процесса и его прогрессии. Однако противовоспалительные препараты не лишены побочных эффектов [1]. Чрезвычайно высокая стоимость препаратов этой группы ограничивает их широкое применение. В связи с этим создание эффективных препаратов на основе лекарственных растений, обладающих выраженными противовоспалительными свойствами, является актуальным. Алкалоиды представляют собой класс природных соединений, обладающий биологической активностью, проявляя адаптогенный, тонизирующий, антиоксидантный, противовоспалительный, ноотропный, противоопухолевый и другие эффекты [2]. Ярким представителем алкалоидсодержащих лекарственных растений является семейство лютиковых (*Ranunculaceae*) – акониты (род *Aconitum*), в частности *A. baikalense* L. Богатая сырьевая база и низкая себестоимость производства делают эти лекарственные средства перспективными для создания на их основе новых, высокоэффективных препаратов. В настоящее время, не существует литературных данных, доказывающих, что *Aconitum baikalense Stenb.* препятствует переходу хронического воспаления в процесс образования опухолей. Учитывая вышесказанное, представляется перспективным изучение экстракта *Aconitum baikalense Stenb* в эксперименте на новой биологической модели MNU - индуцированного воспаления молочной железы.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проведен на 60 мышах-самках линии BALB/C в возрасте 10-14 недель, массой 20-21 г. Животные первой категории поступили из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ (Ветеринарное удостоверение 270 № 0007293). Содержание животных и экспериментальный дизайн были одобрены этическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга и соответствовали международным правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Хроническое воспаление эпителия молочной железы мышей вызывали N-метил-N-нитрозомочевинной (MNU) (Sigma, США) - канцероген используемый для индукции опухоли молочной железы у грызунов. MNU растворяли в физиологическом растворе (0,9 % NaCl). С целью повышения стабильности раствора pH доводили до 4,0 с помощью 0,05 % уксусной кислотой [3]. 14-недельным мышам-самкам канцероген вводили в дозе 50 мг/кг подкожно вдоль вентральной линии между 3-4 парами молочных желез: патологический контроль. Инъекция MNU принимали за 0-й день эксперимента. На 14 сут исследования проводили внешний осмотр и взвешивание животных, пальпацию молочных желез. Объектом исследования являлся экстракт *A. baikalense Stenb.*, полученный из надземной части растения, собранного в природной популяции в фазу цветения [4]. Экстракт в дозе 0,5 мл/кг деалкоголизировали, растворяли в дистиллированной воде и вводили мышам внутривенно с помощью металлического зонда ежедневно на 21 сут после инъекции MNU: опытная группа. Животные патологического контроля получали дисциplinированную воду в эквивалентном объеме. Животных выводили из эксперимента передозировкой CO₂ в острой фазе воспаления на 35 сут эксперимента. Эффективность применяемого лечебного воздействия оценивали с помощью морфологически распознаваемых клеточных элементов в периферической крови и костном мозге, а также гистологических препаратов молочных желез животных. Концентрацию IL-1 β , TGF β , TNF α в гомогенате ткани молочных желез и сыворотке крови оценивали с помощью ИФА (согласно инструкции производителя «Cusabio Biotech CO., LTD»). Методом проточной цитофлюориметрии в ткани молочных желез и цельной крови оценивали содержание стволовых опухолевых клеток (CD44⁺CD24⁻) согласно ранее разработанным протоколам.

Результаты. На 35 сут эксперимента при морфологическом анализе ткани молочных желез мышей, которым вводили MNU наблюдалось развитие целого комплекса патологических изменений, которые соответствовали типичной картине развития хронического воспаления. При изучении экстракта *A. baikalense Stenb* на фоне развития хронического воспаления было показано, что курсовое введение растительного препарата снижало активность воспалительной реакции.

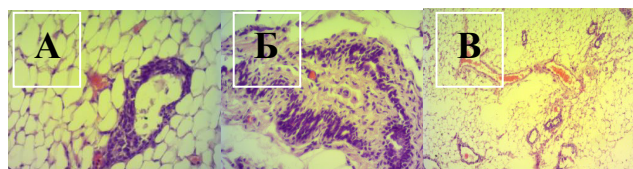


Рис. 1. Морфологическая картина молочных желез мышей линии BALB/C в условиях MNU-индуцированного воспаления на фоне курсового введения экстракта *A. baikalense Stenb*. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 300$, препараты изготовлены на 35 сутки эксперимента. А-контроль, Б-MNU, В-MNU+A. *baikalense Stenb*.

Анализ миелограмм животных в группе патологического контроля показал, увеличение количества основных клеток воспаления: зрелые нейтрофильные гранулоциты и лимфоцитов. В условиях курсового использования растительного экстракта на фоне хронического воспаления молочной железы, показано, снижение содержания в костном мозге количества незрелых нейтрофильных гранулоцитов (в 2,1 раза, $P < 0,01$) и лимфоцитов (в 1,8 раза, $P < 0,01$) относительно таковых показателей в группе патологического контроля. Описанным эффектам в костном мозге соответствовала картина периферической крови.

Из результатов ИФА следует, что инъекция канцерогена приводит к достоверному повышению уровня IL-1 β , TGF- β , TNF- α в 2,7, 11,25, 3,0 раза соответственно в сыворотке животных относительно таковых показателей в группе интактного контроля. Аналогичная картина наблюдалась в гомогенатах молочных желез мышей с воспалением. Применение экстракта *A. baikalense Stenb.* на фоне развития хронического воспаления изменило уровень провоспалительных (IL-1 β , TNF- α) и противовоспалительных (TGF- β) цитокинов в сыворотке крови и гомогенате молочных желез мышей.

Интересен тот факт, что на фоне развития воспаления, наблюдался рост числа стволовых опухолевых клеток в 1,9 раза ($p < 0,05$) в цельной крови и в 1,6 раза ($p < 0,05$) в ткани молочной железы у мышей. Включение экстракта *A. baikalense Stenb.* в схему лечения MNU-индуцированного воспаления приводит к снижению содержания стволовых опухолевых клеток в ткани молочной железы и цельной крови снизилось в 4,3 и 1,7 раза ($p < 0,05$) соответственно, относительно группы мышей с MNU-индуцированным воспалением.

Выводы. Курсовое внутрижелудочное введение мышам экстракта *A. baikalense Stenb.* в дозе 0,5 мл/кг на фоне развития MNU-индуцированного воспаления эпителия молочных желез приводит к снижению выраженности воспаления, а также уменьшению уровня IL-1 β , TNF- α и TGF- β и количества стволовых опухолевых клеток (CD44⁺CD24⁻) в периферической крови и молочной железе животных с MNU-индуцированным воспалением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арльт А.В., Савенко И.А., Сергиенко А.В., Ивашев М.Н. Побочные эффекты нестероидных противовоспалительных средств // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – Т. 11. - № 1. – С. 13-15.
2. Карпова Г.В., Фомина Т.И., Ветошкина Т.В., Боровская Т.Г., Воронова О.Л., Дубская Т.Ю., Суслов Н.И., Абрамова Е.В., Лоскутова О.П., Шерстобоев Е.Ю., Пашинский В.Г., Поветьева Т. Н., Семенов А.А. Доклиническое токсикологическое изучение настойки аконита байкальского (баякона) // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2002. - Т. 65. - №3. - С. 62-65.
3. Faustino-Roch A. I., Ferreira R., Oliveira P. A., Gama A., Ginja M. (2015). N-Methyl-N-nitrosourea as a mammary carcinogenic agent. *Tumour Biol.*, v. 36, no. 12, pp. 9095-9117.
4. Поветьева Т.Н., Пашинский В.Г., Нестерова Ю.В., Пушкарский С.В., Гайдамович Н.Н., Семенов А.А., Жапова Ц., Погодаева Н.Н. Противометастатические свойства алкалоидов аконита байкальского // Сибирский онкологический журнал. - 2005. - №4. - С. 43-46.

УРОВЕНЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНА H3 В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ С НОКАУТОМ

ADAMTS1, THBS1 И RBFOX2

Р.Р. Савченко¹, С.А. Васильев¹, В.С. Фишман²

Научный руководитель: д.б.н., профессор РАН И.Н. Лебедев

¹НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН,

Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки 10, 634050

²Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10, 630090

E-mail: savchenko_renata@mail.ru

H3 GISTONE METHYLATION LEVEL IN THE *ADAMTS1, THBS1* AND *RBFOX2* KNOCKOUT CELL LINES

R.R. Savchenko¹, S.A. Vasilyev¹, V.S. Fishman²

Scientific Supervisor: I.N. Lebedev, D.Sc., Professor of RAS

¹Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center
of Russian Academy of Science, Russia, Tomsk, Nab. Ushaiki str. 10, 634050,

²Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of Russian Academy of Science,
Russia, Novosibirsk, 10 Lavrentyeva Prospect, 630090

E-mail: savchenko_renata@mail.ru

Abstract. *At present, there is an increasing interest in indirect participants of the DNA double-strand breaks repair processes. In this study we aimed to appreciate the effects of ADAMTS1, THBS1, and RBFOX2 genes on the transcriptional regulation through a change in H3K9, H3K27, H3K4 and H3K36 methylation levels in the knockout cell lines. It was shown that the THBS1 and RBFOX2 knockout cell lines were characterized by an elevated the histone H3K9me3 level (1.8- and 1.6-fold, respectively ($p < 0.01$)), while no significant differences were found in other knockout cell lines. Moreover, THBS1 knockout cell line was characterized by an 1.2-fold increase in histone H3K27me3 level ($p = 0.05$). The H3K4 and H3K36 methylation levels were significantly decreased only in RBFOX2 knockout cell line (1.6 and 1.7-fold, respectively ($p < 0.05$)) in comparison with the intact HeLa. Given the effects of knockout of analyzed genes on the DNA repair effectiveness, changes in the pattern of H3 histone methylation can lead to a change in the gene expression level and, as a consequence, affect the regulation of the radiation-induced cell response to DNA damage.*

Введение. Воздействие ионизирующего излучения вызывает значительные повреждения в клетках человека, наиболее губительными из которых являются двунитевые разрывы ДНК [1]. В то время как в литературе обсуждаются, главным образом, два основных механизма репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках млекопитающих (гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов) [2], роль других косвенных участников в формировании радиационно-индуцированного клеточного ответа остаётся недостаточно изученной. Эксперименты, проведенные нами ранее на лимфоцитах периферической крови человека, позволили выявить связь дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1*, *THBS1* и *RBFOX2* со спонтанным уровнем фокусов γ H2AX и 53BP1, являющихся маркерами

процессов репарации, и частотой радиационно-индуцированных центромеро-негативных микроядер, отражающих уровень повреждения ДНК. С целью оценить возможность участия выявленных генов в транскрипционной регуляции процессов репарации ДНК на основе опухолевой линии HeLa были созданы клеточные линии с мутациями в данных генах. Затем, в полученных линиях был проведён анализ уровня метилирования гистона H3 по лизину в позициях 4, 9, 27 и 36. Метилирование H3K9 и H3K27 сопутствует формированию гетерохроматина и рассматривается в первую очередь как модификация гистонов, направленная на подавление транскрипционной активности генов [3], в то время как метилирование H3K4 и H3K36 ассоциировано с эухроматином и активацией экспрессии [4,5].

Материалы и методы исследования. Линии с нокаутом генов *ADAMTS1*, *THBS1* и *RBFOX2* были созданы на основе опухолевой линии HeLa с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. Полученные мутации были охарактеризованы с помощью секвенирования нового поколения (NGS). Метилирование гистонов оценивалось методом иммунофлуоресцентного окрашивания с использованием антител к H3K9me3, H3K27me3, H3K4me3 и H3K36me3.

Результаты. Применение иммуноокрашивания позволило установить, что линии с мутациями в генах *THBS1* и *RBFOX2* характеризовались повышением уровня H3K9me3 по сравнению с исходной линией HeLa (в 1,8 и 1,6 раза, соответственно; $p < 0,01$). Кроме того, линия с мутацией в гене *THBS1* отличалась повышенным уровнем H3K27me3 (в 1,2 раза; $p = 0,05$). Тенденция к повышению уровня H3K9me3 наблюдалась в линии с мутацией гена *ADAMTS1* (в 1,5 раза), однако значимых отличий выявлено не было (рис. 1).

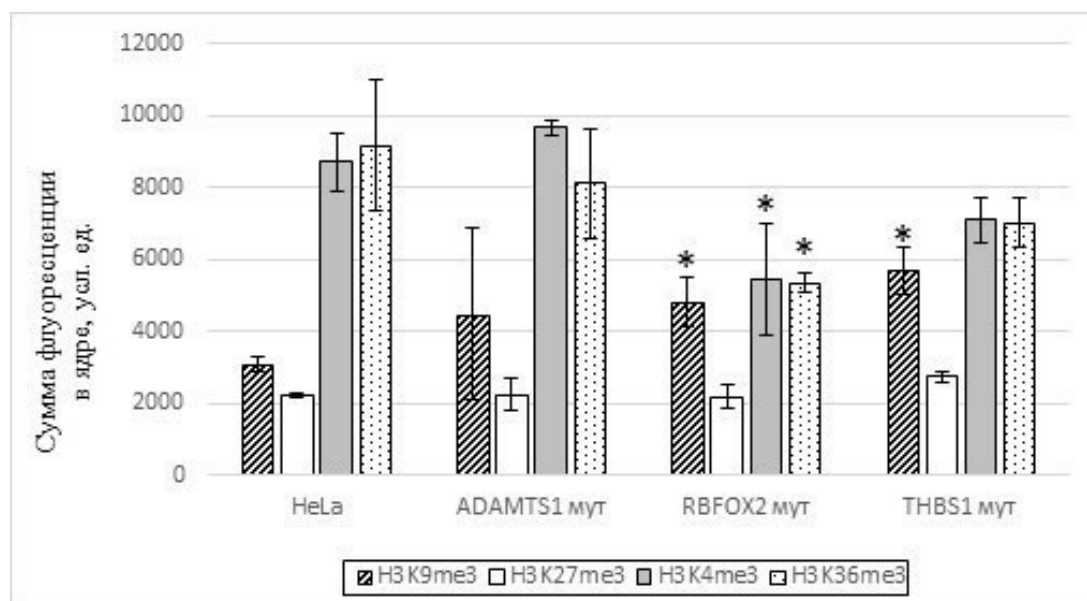


Рис.1 Влияние мутаций в генах *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1* в клеточной линии HeLa на уровень метилирования гистонов в необлученных клетках

Снижение уровня метилирования гистона H3 по лизину в позициях 4 и 36 было отмечено только для линии с мутацией в гене *RBFOX2* (в 1,6 и 1,7 раз, соответственно; $p < 0,05$) (рис. 1).

Обращает на себя внимание паттерн метилирования гистона H3 в линии с мутацией *RBFOX2*. С одной стороны, данная линия характеризуется повышенным уровнем H3K9me3, традиционно связанным с подавлением активности генов, с другой стороны, данный эффект усиливается снижением уровней H3K4me3 и H3K36me3. Однако, как и в случае с *THBS1*, механизмы влияния *RBFOX2* на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов через уровень метилирования гистонов в настоящий момент остаются неясными.

Заключение. Поскольку ранее нами было показано, что экспрессия генов *ADAMTS1*, *THBS1* и *RBFOX2* коррелирует со спонтанным уровнем фокусов γ H2AX и 53BP1 и частотой радиационно-индуцированных микроядер, выявленные в данной работе гены, по-видимому, опосредованно влияют на уровень репарации двунитевых разрывов ДНК. Возможно, это влияние осуществляется на уровне эпигенетической регуляции через изменение уровня метилирования гистона H3, однако вопрос о причине изменения рисунка метилирования данного гистона в линиях с мутациями обсуждаемых генов на сегодняшний день остаётся открытым. Несмотря на это, изучение роли косвенных участников процессов репарации ДНК остаётся актуальным, поскольку может внести значительный вклад в развитие понимания механизмов, лежащих в основе индивидуального ответа соматических клеток человека на воздействие мутагенных факторов, включая ионизирующее излучение.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 16-34-50178 и гранта Президента Российской Федерации МК-5944.2018.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Santivasi, W. L., Xia, F. (2014). Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxidants & Redox Signaling*, Vol. 21, no. 2, pp. 251-259.
2. Lomax, M. E., Folkes, L. K., O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clinical Oncology*, no. 25, pp. 578-585.
3. Allshire, R. C., Madhani, H. D. (2017). Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, doi:10.1038/nrm.2017.119.
4. Martin, C., Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 6, no. 11, pp. 838-849.
5. Miller, J. L., Grant, P. A. (2013). The role of DNA methylation and histone modifications in transcriptional regulation in humans. *Subcellular Biochemistry*, no. 61, pp. 289-317.

**ГЕМОСТИМУЛИРУЮЩИЕ И ЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИСАХАРИДОВ TUSSILAGO
FARFARA L. В УСЛОВИЯХ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ**

Е. А. Сафонова, К.А. Лопатина, В.А. Машанова

Научный руководитель: д.б.н.. Т. Г. Разина

"Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени

Е.Д. Гольдберга

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634028

E-mail: safonova_7@mail.ru

**HEMOSTIMULATING AND PROTECTIVE PROPERTIES OF POLYSACCHARIDES TUSSILAGO
FARFARA L. IN CONDITIONS OF POLYCHEMOTHERAPY**

E.A. Safonova, K.A. Lopatina, V.A. Mashanova

Scientific Supervisor: PhD T.G. Razina,

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical

Center, Russian Academy of Sciences, Lenin Ave., 3, 634028

E-mail: safonova_7@mail.ru

***Abstract.** Using the method of Comet Assay, it has been established that the use of Tussilago farfara L. polysaccharides in C57BL/6 mice leads to decrease apoptosis level and damage in DNA caused by polychemotherapy in bone marrow and small intestine epithelium cells. This indicates of the genoprotective polysaccharides properties.*

Введение. В настоящее время препараты платины входят в состав стандартов лечения онкологических больных с различной локализацией опухолей. Одним из представителей этой группы является цисплатин, на основе которого разрабатываются и внедряются в клиническую практику новые схемы цитостатического лечения [1]. Агрессивное воздействие полихимиотерапии приводит к повреждению не только опухоли, но и здоровых органов и тканей, в частности, костного мозга, печени и тонкого кишечника. Перспективными агентами для коррекции нарушений, вызванных противоопухолевыми препаратами, являются полисахариды. В предыдущих исследованиях показано, что совместное применение этих веществ и цитостатиков в монорежиме снижает гематологическую токсичность, способствует повышению устойчивости печени и слизистой оболочки тонкого кишечника к действию противоопухолевых препаратов [2]. Однако в условиях полихимиотерапии корректорные свойства этих веществ не исследованы.

Цель исследования. Изучить возможность снижения гематологической токсичности, а также степени повреждения ДНК в костном мозге и тонком кишечнике мышей с помощью полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной при цисплатинсодержащей комбинированной терапии.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на мышцах-самках линии C57BL/6 с раком легкого-67 и карциномой легких Льюис. Комбинации цитостатиков: цисплатин (2,5 мг/кг) + этопозид (5 мг/кг); цисплатин (2,5 мг/кг) + паклитаксел (12 мг/кг); цисплатин (2,5 мг/кг) + иринотекан (10 мг/кг)

вводили мышам внутривенно, трехкратно. Нейпоген в дозе 125 мкг/кг и рекормон в дозе 10 Ед/мышь вводили подкожно в течение 5 сут. Мыши получали полисахариды внутривенно в дозе 20 мг/кг в течение 23 сут. Показатели периферической крови определяли на гематологическом анализаторе «Muclic 18 vet» (Cormay, Франция), подсчет миелограмм, определение ретикулоцитов в периферической крови и основных показателей роста опухоли и метастазов проводили по стандартным методикам. Степень повреждения ДНК в костном мозге и тонком кишечнике оценивали с помощью метода «ДНК-комет» [3]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью критерия Вилкоксона-Манна-Уитни, критерия Стьюдента и углового преобразования Фишера.

Результаты. В костном мозге мышей с перевиваемыми опухолями, получавших полисахариды на фоне полихимиотерапии, общее количество миелокариоцитов, эритрокариоцитов, зрелых и незрелых нейтрофильных гранулоцитов было значимо выше относительно этих показателей у животных, леченных только цитостатиками. В периферической крови мышей отмечено увеличение общего количества лейкоцитов за счет повышения числа палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов. Количество ретикулоцитов, содержание зрелых эритроцитов, показатели гемоглобина и гематокрита были достоверно выше таковых у животных, получавших только полихимиотерапию. Гематокорригирующее действие полисахаридов оказалось сравнимо с таковым у известных гемостимуляторов нейпогена и рекормона.

При оценке влияния полисахаридов на индуцируемую цисплатином и иринотеканом генотоксичность в тонком кишечнике установлено, что картина клеток, образующих ДНК-кометы, практически не отличалась от таковой в группе интактных животных. Оценка степени повреждения ДНК клеток показала, что % ДНК в хвосте кометы и % апоптотических ДНК-комет были значимо ниже по сравнению с этими значениями, у мышей, получавших только полихимиотерапию. На препаратах костного мозга животных, которым вводили цитостатики по схеме «цисплатин + паклитаксел» совместно с полисахаридами *Tussilago farfara L.*, регистрировались неповрежденные клетки, апоптотических ДНК-комет практически не наблюдалось. % ДНК - повреждений и % апоптотических ДНК-комет в этой группе исследования были достоверно ниже, относительно этих показателей у животных, леченных только цитостатиками (рисунок 1 а, б, в).

При добавлении полисахаридов в схемы полихимиотерапии отмечено, что масса опухоли, частота метастазирования, количество и площадь метастазов были значимо ниже таковых у мышей, получавших цитостатики изолированно.

Выводы. Добавление полисахаридов *Tussilago farfara L.* в схемы полихимиотерапии приводит к снижению миелосупрессии в отношении эритроидного и гранулоцитарного ростков кроветворения, уменьшению ДНК-повреждений в костном мозге и тонком кишечнике и повышению противоопухолевого и антиметастатического действия цитостатиков.

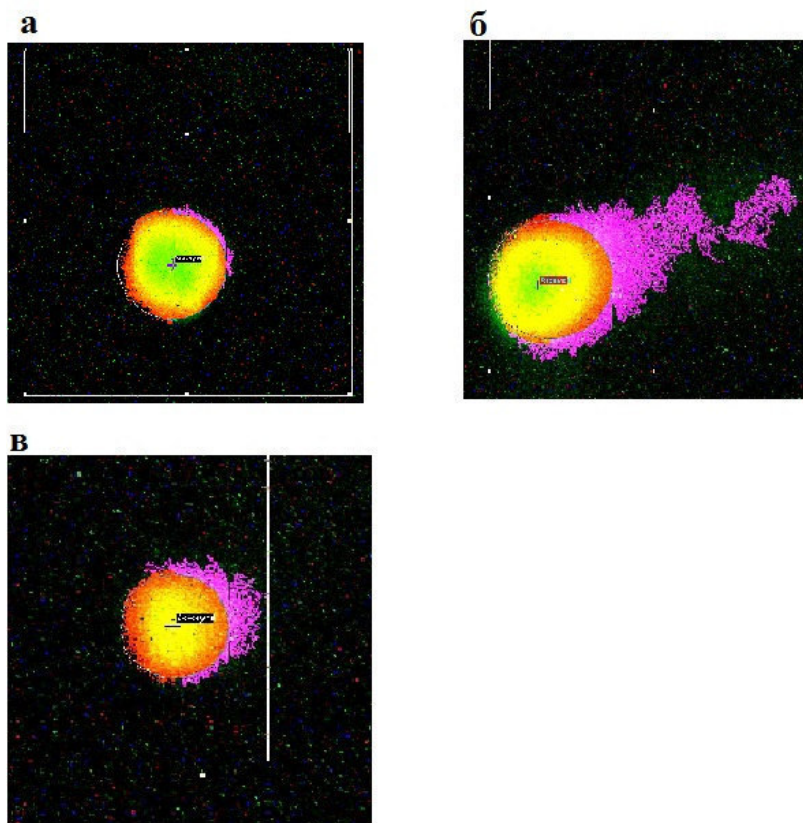


Рис 1. ДНК-кометы, формируемые клетками тонкого кишечника мышей: а – в негативном контроле (интактные животные); б – после применения полихимиотерапии по схеме «цисплатин+уринотекан» в – после применения полихимиотерапии по схеме «цисплатин+уринотекан» совместно с полисахаридами *Tussilago farfara* L. (x 200)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов М.Е., Мащелуева А.Ю. Цисплатин-эбеве. // Актуальность вопросов применения. Эффективная фармакотерапия. – 2011. - № 22. – С. 42-45.
2. Сафонова Е.А., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Лопатина К.А., Ефимова Л.А., Гурьев А.М., Рыбалкина О.Ю., Хотимченко Ю.С. Перспективы использования полисахаридов растений в комплексной терапии злокачественных опухолей. // Экспер. и клинич. фармакол. – 2012. - №75. – Т. 9. – С. 42-47.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ 2 - е изд., перераб. и доп. / Под ред. Р.У. Хабриева. - М.: Медицина; 2005. - 832 с.

**ВЛИЯНИЕ АЛИМЕНТАРНОГО ДИСБАЛАНСА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕРВНОЙ
СИСТЕМЫ РАСТУЩИХ КРЫС-САМОК**

К.Е. Сычева, Д.В.Шестаков

Научный руководитель: доцент, к.б.н. Е.В. Позднякова
Карагандинский государственный медицинский университет
Казахстан, г.Караганда, ул. Гоголя,40, 100012
E-mail: SychevaK@kgmu.kz

**INFLUENCE OF ALIMENTARY DISBALANCE ON SOME INDICATORS OF GROWING RAT-
FEMALE'S NERVOUS SYSTEM**

K.E. Sycheva, D.V.Shestakov

Scientific Supervisor: assist.professor, c.b.s. E.V. Pozdnyakova
Karaganda State Medical University, Kazakhstan, Karaganda, Gogol str., 40, 100012
E-mail: SychevaK@kgmu.kz

***Abstract.** In the present article, the main purpose is study influence of alimentary disbalance on some indicators of growing rat-female's nervous system. Disbalance consisted of protein deficiency and an excess of lipid-carbohydrate components in food, compiled according to the recommendations of V. Ya. Shably. The research was on 30 impuberal female rats. Tracking of behavioral response's change was assessed by the "Open Field" method. As a result of experiments was established an increase of locomotor activity, however, some aspects in the final test indicated the presence of anxiety and fear. Also was registered the decrease in rats' emotional activity of the experimental group, moreover was fixed an increase in all indicators of products of lipid peroxidation. Made conclusions about the effect of a fixed experimental diet on behavioral reactions and products of lipid peroxidation of the brain.*

Введение. Образовательный процесс в современном мире сопровождается высоким уровнем информационного потока и стрессами. Смена режима, неумение рационально расставить приоритеты и равномерно распределить нагрузку в течение дня – все эти факторы вызывают у молодых людей психоэмоциональный дискомфорт, который усиливается нерациональным и несбалансированным питанием. [1] Доказано, что нерациональное и неадекватное питание приводит к снижению, в различной степени выраженности, уровня умственной работоспособности у юношей и у девушек. [2] Так же исследования показали, что у молодых людей с низкокачественным рационом питания увеличиваются шансы на получение статуса хулигана по сравнению с показателями у молодых людей со сбалансированным рационом. Такая связь не обнаруживалась между качеством диеты и статусом жертвы. [3] В результате могут сформироваться неправильные модели пищевого, соматического и психического поведения, что в результате может привести к возникновению различных патологических состояний. Цель исследования – изучить влияние алиментарного дисбаланса с недостатком белка и избытком углеводно-липидного компонента на поведенческие реакции и окислительный метаболизм головного мозга растущих самок-крыс.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проводился на 30 белых беспородных крысах. Животные были разделены на две группы. В 1-ю группу входили 15 неполовозрелых самок, содержащихся на общевиварном, сбалансированном рационе. Во 2-ю группу входили - 15 неполовозрелых самок, получавших ежедневно полусинтетический рацион с дефицитом белка и избытком углеводно-липидного компонента. Рацион был составлен согласно рекомендациям В.Я. Шаблий. [4] Срок эксперимента составил 30 суток. По завершению эксперимента животные были умерщвлены методом неполной декапитации под легким эфирным наркозом согласно «Международной рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных». [5] Гомогенизацию тканей головного мозга проводили с использованием жидкого азота.

Поведенческие реакции оценивали по тесту «Открытое поле». Тест проводился на открытой площадке, диаметром 150 см, разделенной на квадраты и ограниченной непрозрачными бортами, высотой 50 см. Регистрация поведенческих паттернов осуществлялась визуально, в течение 2 мин. Фиксировались следующие показатели: локомоция, обнюхивание, стойка, стойка с опорой, груминг (акт косметической чистки), акты уринации и дефекации. [6]

Интенсивность продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате головного мозга оценивали по содержанию: диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов (КД) по методу В.Н. Ушкаловой и Г.Д. Кадочниковой [7]; малонового диальдегида (МДА) по методу М.С. Гончаренко и А.М. Латыповой [8].

Полученные данные были обработаны методом вариационной статистики: среднее арифметическое выборки (\bar{X}), среднее квадратичное отклонение (S), ошибку среднего арифметического (m). Статистическую значимость различий оценивали по критерию Манна-Уитни.

Результаты. В результате проведенных исследований было установлено, что у растущих крыс-самок, находящихся 30 суток на рационе с дефицитом белка и избытком углеводно-липидного компонента, происходит увеличение локомоторной активности на 84,2% ($p < 0,01$), при этом количество пересеченных квадратов меньше уровня контроля на 23,2 % ($p < 0,01$). Самки были очень подвижны, перемещение происходило внутри самих квадратов, выход в центр практически не фиксировался, что говорит о состоянии беспокойства и страха.

Показатели ориентировочно-исследовательского поведения снизились – количество актов обнюхивания на 24,8% ($p < 0,01$), количество актов стойки и стойки с опорой снизились на 58% ($p < 0,01$) и на 50% ($p < 0,05$) соответственно. Снижение показателей исследовательского поведения подтверждает состояние тревоги и страха у опытной группы растущих крыс-самок.

Показатели косметической чистки полностью отсутствуют в опытной группе самок-отъемышей. Количество актов дефекации снизилось на 45 % ($p < 0,05$), акты уринации полностью отсутствуют в опытной группе. Изменение этих показателей свидетельствует о том, что у животных произошло снижение эмоционального восприятия.

Основным параметром оценки наличия окислительного стресса является накопление первичных и вторичных продуктов свободнорадикального окисления. В силу стабильности продукты перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), такие как - диеновые конъюгаты (ДК) и кетодиены (КД) и основной продукт реакции с тиобарбитуровой кислотой – малоновый диальдегид (МДА) являются наиболее информативными показателями наличия окислительного стресса.

В результате проведенных исследований было установлено, что в группе самок-отъемышей, находящихся 30 суток на рационе с дефицитом белка и избытком углеводно-липидного компонента, происходит увеличение всех показателей продуктов перекисного окисления липидов.

Уровень диеновых конъюгатов возрос на 36,7% ($p<0,01$), уровень кетодиенов увеличился на 58,1% ($p<0,05$), показатели уровня малонового диальдегида увеличились незначительно на 11% ($p<0,01$).

Выводы. Таким образом, в результате проведенных исследований можно сделать вывод, рацион с дефицитом белка и избытком углеводно-липидного компонента негативно влияет на показатели перекисного окисления липидов головного мозга растущих крыс – самок – происходит увеличение всех основных показателей свободно-радикального окисления. Это находит отражение в изменениях структуры поведения у растущих крыс-самок – они демонстрируют девиантное поведение – резкие перебежки на короткие расстояния, боязнь исследования новой территории, отсутствие груминга и метки территории – все это говорит о подавленном эмоциональном состоянии и высоком уровне тревоги и страха.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кожевникова Н.Г, Катаева В.А. Гигиенические аспекты формирования здорового образа жизни студентов // Гигиена и санитария.- 2011. № 6. - с.48-51.
2. Каштанова С.Г. Физиолого-гигиеническая оценка фактического питания и алиментарного статуса студентов медицинского ВУЗа: Автореф. Дис. канд. мед. наук. – Оренбург, 2013. – 20 с.
3. Jackson D.B. (2017) Diet quality and bullying among a cross-national sample of youth. *Reventive medicine.* pp. 359-365
4. Шаблий В.Я., Игнатъев А.Д., Керимова Н.Г. и др. Методические рекомендации, по биологической оценке, продуктов питания. – Москва. – 1973. – 30 с.
5. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // Хроника ВОЗ. – 1985. – Т.39. – №3. – С.3-9
6. Lin Y.H., Liu A.H., Xu Y., Tie L., Yu H.M. Li X.J. (2005) Effect of chronic unpredictable mild stress on brain-pancreas relative protein in rat brain and pancreas. *Behavior brain research.* no. 165(1). pp. 63–71.
7. Ушкалова В.Н., Кадочникова Г.Д. Использование параметров, характеризующих активность перекисного окисления липидов при изучении адаптации человека к новым климатогеографическим условиям// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1987. – №5. – С.571 – 573.
8. Гончаренко М.С., Латипова А.М. Метод оценки перекисного окисления липидов// Лабораторное дело. – 1985. – №1. – С.60-61.

**ГОРМОНЫ СТРЕССА: КОРТИЗОЛ, АДРЕНОКОРТИКОТРОПНЫЙ ГОРМОН И ОКСИТОЦИН
В КОНТЕКСТЕ СОЦИАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ
ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА**

А.В. Тимофеева, Ю.Ю. Филиппова

Научный руководитель: профессор, д.м.н. А.Л. Бурмистрова

Челябинский государственный университет,

Россия, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129, 454000

E-mail: avtimofeewa@gmail.com

**STRESS HORMONES: CORTISOL, ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE AND OXYTOCIN
IN THE CONTEXT OF SOCIAL VIOLATIONS
IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS**

A.V. Timofeeva, Yu.Yu. Filippova

Scientific Supervisor: Prof., Dr. A.L. Burmistrova

Chelyabinsk State University,

Russia, Chelyabinsk, Bratiev Kashirinih st., 129, 454001

E-mail: avtimofeewa@gmail.com

***Abstract.** Autism spectrum disorders (ASD) refer to heterogeneous disorders of neurodevelopment, the main symptom of which is social insufficiency. Aim: to conduct a one-stage assessment of the relationship between key hormones in the regulation of social and stress responses: adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol, oxytocin, in children with ASD in the context of severe social insufficiency. Materials and methods. A total of 44 children (37 boys and 7 girls) aged 3 to 12 years with a diagnosis of ASD were examined, which were divided into groups: with preserved social contact / lack of it. The concentrations of hormones were evaluated in blood plasma by the method of ELISA. Results. ACTH and cortisol demonstrate interdependent relationships without the involvement of oxytocin in children with ASD, while maintaining their social contact. In children with ASD with symptoms of social insufficiency, there are no correlations between the studied neurohormones. The conclusion. The data obtained suggest that the processes of disorganization / destruction of neuroanatomical and physiological connections between the systems of oxytocin and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA-axis) and (or) the hypothalamic-neurohypophysis system and the HPA-axis.*

Введение. Расстройства аутистического спектра (РАС) относятся к гетерогенным нарушениям нейроразвития, для которых характерны ранние общие симптомы: дефициты коммуникации и речи, наличие узких интересов, однотипное поведение, выраженная социальная недостаточность и гипер-/гипоотвечаемость на различные (часто обычные, бытовые) сигналы, что приводит к атипичному ответу на стресс (в т.ч. социального характера). Ключевыми гормонами, вовлеченными в регуляцию социальных и стресс-ответов, выступают окситоцин и кортизол, которые, как показано рядом авторов, связаны с симптомами РАС. Окситоцин — нейропептид, освобождается в ходе социальных взаимодействий, и играет одну из определяющих ролей в социальной регуляции реактивности к стрессорам и поведению [1]. Другим гормоном нейроэндокринной системы – продуктом гипоталамо-

гипофизарно-адреналовой оси (ГГА-оси), участвующим в поддержании связи родители-дети и играющим центральную роль в социальном поведении, в том числе в стресс-социальных ситуациях, возникающих в ходе групповых отношений, является кортизол [2]. Известно, что для инициации развития адаптации и включения программ оптимального развития мозга перед и после рождения, необходимо функционирование ГГА-оси матери. Кроме того, большим эндокринным компонентом в адаптивном стресс-ответе выступает активация ГГА-оси, ассоциированной с секрецией кортикотропин-релизинг гормона, адренкортикотропного гормона (АКТГ) и кортизола [3]. Недавно высказано предположение, что кортизол-индуцированное увеличение окситоцина, возможно, вовлечено в регуляцию петли обратной связи ГГА-оси [4], что может отражать важные взаимодействия между кортизол-иницированным стрессом и окситоцином. Цель исследования: провести одномоментную оценку взаимосвязи ключевых гормонов регуляции социальных и стресс-ответов: АКТГ, кортизола, окситоцина, у детей с РАС в контексте выраженной социальной недостаточности.

Материалы и методы. Было обследовано 44 ребенка с РАС: 37 мальчиков (84%) и 7 девочек (16%), в возрасте от 3 до 12 лет. Дети, включенные в исследование, имели диагнозы по МКБ-10: F84.0 (детский аутизм), F84.1 (атипичный аутизм) и F83.1 (задержка психо-речевого развития с аутистически подобным поведением). Более 60% детей имели функциональные нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), сопровождавшиеся болью, ощущением дискомфорта и другими симптомами. На основании клинического анамнеза, в зависимости от наличия/ отсутствия социального контакта (учитывались признаки: присутствие зрительного контакта, узнавания матери, общение с другими детьми) обследованные были поделены на две группы: 23 ребенка с отсутствием симптомов социального контакта и 21 человек с сохраненным социальным контактом. Группу сравнения составили 39 типично развивающихся детей (ТРД) соответствующего пола и возраста. У всех родителей получено информированное согласие об участии. Работа одобрена этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 1 от 16.05.2016). Забор крови осуществлялся натощак, после процедуры сбора слюны. Концентрацию АКТГ, кортизола и окситоцина оценивали в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа наборами реагентов фирм Хема (Москва, Россия), Biomerica (California, USA), Peninsula Lab. International Inc. (Калифорния, США). Для оценки значимости межгрупповых различий использовали критерий Стьюдента. Для обнаружения взаимосвязей гормонов кортизол/АКТГ, кортизол/окситоцин, АКТГ/окситоцин с социальным поведением детей с РАС применяли корреляционный анализ. Все расчеты и графические построения выполнены в пакете Past 3.18.

Результаты. В ходе работы нами были определены межгрупповые различия по уровню окситоцина в группах ТРД и детей с РАС с сохраненным социальным контактом/отсутствием социального контакта. У детей с РАС без социализации наблюдались достоверно низкие уровни окситоцина в плазме крови в сравнении с детьми из групп ТРД и РАС, с сохраненным социальным контактом. Далее нами были определены корреляционные взаимосвязи кортизол/АКТГ/окситоцин в группах детей с РАС с наличием/отсутствием социального контакта и группе ТРД. В группе ТРД - положительная корреляционная связь наблюдается в паре кортизол/окситоцин с уровнем значимости $p=0,035$. В паре кортизол/АКТГ и АКТГ/окситоцин не отмечено корреляционных взаимосвязей. В группе детей с РАС, с сохраненным социальным контактом, отмечается положительная корреляционная связь с уровнем значимости 0,029 в паре кортизол/АКТГ. В парах кортизол/окситоцин и АКТГ/окситоцин

корреляционных взаимосвязей не обнаружено. В группе детей с РАС с нарушенным социальным контактом в парах кортизол/АКТГ, кортизол/окситоцин, АКТГ/окситоцин корреляционные связи отсутствовали.

Заключение. Таким образом, результаты одномоментной оценки трех нейрогомонов: АКТГ, кортизола и окситоцина, у детей с РАС, свидетельствуют, что при сохранении социального контакта у детей с РАС АКТГ и кортизол демонстрируют взаимозависимые отношения без привлечения окситоцина. В то же время у детей с РАС, с симптомами социальной недостаточности, отсутствуют корреляции между изученными нейрогомонами, что, как мы считаем, отражает не только присутствие социальной дисфункции у таких детей, но и свидетельствует о наличии дезорганизации/деструкции нейроанатомических и физиологических связей между системами окситоцина и ГГА-оси и (или) гипоталамо-нейрогипофизальной системой и ГГА-осью. Интересно, что 74% таких детей имели функциональные изменения со стороны ЖКТ, сопровождавшиеся болью и ощущением дискомфорта, и трансформацию композиции микробного сообщества тонкой кишки, по сравнению с другими детьми с РАС и с ТРД, а, следовательно, измененные паттерны сигнальных молекул. В настоящее время высказана точка зрения, что регионы мозга, вовлеченные в сенсорный компонент физической боли, интегрированы и с компонентом социального одиночества, что может проявляться уникальным дистрессом. Следовательно, можно предположить, что весь банк регуляторных молекул, обеспечивающий социальное поведение через нейро-эндокринную, нейроиммунную и автономную нервную системы, оказывает влияние на функцию мозга и, в итоге, играет важную роль в манифестации аутистического поведения [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carter C.S. (1998). Neuroendocrine perspectives on social attachment and love. *Psychoneuroendocrinology*, no 23 (8), pp. 779-818.
2. Meyer-Lindenberg A., Domes G., Kirsch P., Heinrichs M. (2011). Oxitocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nat Rev Neurosci*, no. 12 (9), pp. 524-538.
3. Gordon I., Zagoory-Sharon O., Leckman J.F., Feldman R. (2010). Oxytocin, cortisol, and triadic family interactions. *Physiol Behav.*, no. 101 (5), pp. 679-684.
4. Tops M., Buisman-Pilman F.T., Boksem M.A., Wijers A.A., Korf J (2012). Cortisol-induced increases of plasma oxytocin levels predict decreased immediate free recall of unpleasant words. *Front Psychiatry.*, no 3:43, pp. 1-5.
5. Engelmann M., Landgraf R., Wotjak C.T. (2004). The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.*, no 25 (3-4), pp. 132-149.

**ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
РЕАЛИЗАЦИИ ГИДРООСМОТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ВАЗОПРЕССИНА В ПОЧКЕ КРЫС**

В.В. Третьякова

Научный руководитель: доцент, к.б.н. А.В. Фатьянова
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет
Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090
E-mail: ladydaae@mail.ru

**THE DEXAMETASON INFLUENCE ON THE MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF
THE VAZOPRESSIN HYDROOSMOTIC EFFECT REALIZATION IN RAT KIDNEY**

V.V. Tretyakova

Scientific Supervisor: Associate Professor, Cand. of Biol. A.V. Fatianova
Novosibirsk State University
Russia, Novosibirsk, Pirogova str, 2, 630090
E-mail: ladydaae@mail.ru

***Abstract.** Some morphofunctional characteristics of osmotic concentration of the rat kidney with dexamethasone under conditions of normal and decreased secretion of endogenous vasopressin have been studied. Different degrees of dexamethasone influence are shown depending on the level of vasopressin in the blood of rats on a number of functional (urine osmolality, osmotic concentration index, distribution of sodium, potassium, urea, water in different functional zones of the kidney) and structural (subcapsular space size of nephrons, height of inner medulla collecting duct epithelium, histochemical detection of acidic glycosaminoglycans) parameters.*

Введение. Основным гормоном поддержания водно-солевого гомеостаза является нейрогипофизарный вазопрессин (ВП) [4]. ВП приводит к росту осмотической водной проницаемости главных клеток собирательных трубок (СТ) путем увеличения количества водных каналов AQP2 в апикальной мембране [3]. В настоящее время активно изучаются гормональные и паракринные факторы, модулирующие гидроосмотический эффект ВП [2]. Дексаметазон, относящийся к группе фторированных синтезированных глюкокортикоидов, не обладает минералокортикоидными свойствами [5]. Он оказывает свое действие путем связывания с глюкокортикоидными рецепторами, которые экспрессируются в мезангиальных клетках [1]. В литературе имеются разрозненные данные о том, что дексаметазон способен изменять водно-солевой баланс организма, однако остается недостаточно изученным механизм этого процесса. В связи с этим целью работы явилось изучение влияния дексаметазона на морфофункциональные характеристики реализации гидроосмотического эффекта ВП в почке крыс.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на крысах линии WAG с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Животные были разделены на 4 группы: контроль, группа гидратации (содержание на корме повышенной влажности для подавления секреции эндогенного ВП), группа введения дексаметазона (0,1 мг/100 г массы тела, 2 раза в день, в течение 2 суток, внутримышечно), группа сочетанного воздействия

гидратации и дексаметазона (0,1 мг/100 г массы тела, 2 раза в день, в течение 2 суток, внутримышечно). Проведено изучение функциональных параметров процесса осмотического концентрирования: осмоляльность мочи и плазмы крови криоскопическим методом, рассчитан индекс осмотического концентрирования. Содержание катионов натрия и калия в разных функциональных зонах почки определяли методом атомно-адсорбционной спектроскопии, количество мочевины – диацетилмонооксидным методом, обводненность рассчитывали по массе влажной и сухой ткани. Выполнено светооптическое изучение почки экспериментальных животных. На срезах, окрашенных алциановым синим, проведено исследование локализации кислых гликозаминогликанов в коре, наружном и внутреннем мозговом веществе почки. Морфометрическое изучение осуществили в пакете программ AxioVision 4.6: исследованы размер подкапсулярного пространства нефрона и высота эпителия СТ средней трети внутреннего мозгового вещества почки. Достоверность различий между группами оценивали по t-критерию Стьюдента для независимых выборок с использованием пакета программ Statistica 8.0. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Эффективность осмотического концентрирования можно оценить по уровню осмоляльности экскретируемой мочи. Гидратация приводит к существенному снижению осмоляльности мочи ($p < 0,001$ по сравнению с контролем), что согласуется с механизмом секреции и действия ВП. Введение дексаметазона, напротив, привело к достоверному увеличению осмоляльности мочи ($p < 0,05$ по сравнению с контролем), что может указывать на модулирующее влияние дексаметазона на процесс осмотического концентрирования. Дексаметазон на фоне подавленной секреции ВП также вызвал усиление процесса осмотического концентрирования ($p < 0,01$ по сравнению с группой гидратации). Осмоляльность плазмы крови является строгим гомеостатическим параметром. Наблюдалась тенденция к увеличению этого параметра в экспериментальных группах, однако она находится в пределах физиологической нормы. Индекс осмотического концентрирования, рассчитываемый как отношение осмоляльностей мочи к плазме крови, существенно снизился в группе гидратации, что согласуется с уменьшением осмоляльности свободно экскретируемой мочи. Индексы в группах введения дексаметазона и сочетанной – ниже, чем в контроле, однако эти изменения не достоверны. Изменение осмоляльности мочи может быть связано с изменением уровня реабсорбции воды и солей в канальцах нефрона и СТ. Транспорт воды осуществляется через водные каналы – аквапорины, однако важную роль в токе воды играет осмотический градиент, создаваемый мочевиной и катионами натрия. В группе гидратации произошло снижение кортико-медуллярных градиентов мочевины, натрия и калия. Выявлено уменьшение содержания мочевины во всех зонах почки, что указывает на понижение осмотического градиента для реабсорбции воды. Эффект гидратации на количественное содержание натрия и калия в коре, наружном и внутреннем мозговом веществе почки практически не выражен. Общая обводненность почки возрастает в коре, что может быть связано с увеличением гистохимически выявляемых кислых гликозаминогликанов, выявляемых на срезах, окрашенных алциановым синим. Эти молекулы межклеточного матрикса могут создавать гель, удерживающий воду и препятствующий дополнительному току воды через межклеточные структуры. В средней трети сосочка почки также отмечено усиление окрашивания гликозаминогликанов. Данная зона содержит СТ, эпителий которых чувствителен к ВП и отвечает за гормон-регулируемую реабсорбцию воды. Морфометрическое изучение показало достоверное снижение высоты эпителия ($p < 0,001$ по сравнению с контролем), что

свидетельствует об изменении транспортных процессов. Введение дексаметазона сопровождается увеличением кортико-медуллярного градиента мочевины. Это может быть связано с накоплением мочевины во внутреннем мозговом веществе почки и последующим возрастанием осмотического градиента для реабсорбции воды. Функциональные данные подтверждаются морфометрическими: достоверное возрастание высоты эпителия ($p < 0,001$ по сравнению с контролем) указывает на изменение проницаемости клеток. Гистохимическое изучение разных зон почки не выявило различий с группой контроля, что может быть связано с отсутствием эффекта дексаметазона по отношению к проницаемости межклеточного матрикса. Также не обнаружено достоверного влияния дексаметазона на кортико-медуллярные градиенты натрия и калия. Эффекты дексаметазона на фоне подавленной секреции эндогенного ВП (в группе сочетанного воздействия) выразились в накоплении мочевины и натрия в коре и внутреннем мозговом веществе почки. Это не привело к изменению кортико-медуллярных градиентов, однако усилило осмотический градиент для реабсорбции воды и достоверно снизило обводненность тканей почки по сравнению с группой гидратации. Состояние интерстициального барьера для реабсорбции воды при гистохимическом изучении, а также высота эпителия СТ указывают на преобладание влияния дексаметазона. Подкапсулярное пространство нефрона является структурным коррелятом уровня фильтрации в нефроне. Этот параметр изменился только в группе действия дексаметазона на фоне подавленной секреции ВП, что указывает на отсутствие эффекта дексаметазона в условиях физиологической концентрации ВП в крови крыс.

Выводы. Дексаметазон вызывает усиление осмотического концентрирования в присутствии эндогенного ВП посредством активации транспортных процессов через эпителии СТ средней трети внутреннего мозгового вещества почки, а также повышая кортико-медуллярный градиент мочевины, что создает осмотический градиент для реабсорбции воды. В условиях подавленной секреции эндогенного ВП дексаметазон, кроме влияния на мочевины и транспортные процессы в эпителии СТ, вызывает накопление натрия в коре и внутреннем мозговом веществе почки и изменение подкапсулярного пространства, что модулирует процессы мочеобразования и приводит к усилению концентрирующей функции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/fg_index_id_287.htm – 28.02.2018.
2. Вандер А. Физиология почек. / Перевод с англ. Г.А. Лаписа под общ. ред. Ю.В. Наточина – Спб.: Издательство «Питер», 2000 – 256 с.
3. Hoenig P.M., Zeidel L.M. (2014). Homeostasis, the Milieu Interieur, and the Wisdom of the Nephron. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*. no. 9, pp. 1272-1281.
4. Айзман Р.И. Формирование функции почек и водно-солевого обмена в онтогенезе // Новые исследования. – 2009. – № 3. – С. 108-120.
5. Blot-Chaubaud M., Djelidi S., Courtois-Coutry N., Fay M., Cluzeaud F., Hummler E., Farman N. (2001). Coordinate control of Na,K-atpase mRNA expression by aldosterone, vasopressin and cell sodium delivery in the cortical collecting duct. *Cellular and Molecular Biology*, no. 2, pp. 247-253.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ В
ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗЕ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

Е.А. Тугутова, А.И. Князькова, А.А. Цыденова

Научный руководитель: д.м.н. Н.В. Юнусова

НИИ онкологии, Томский НИМЦ,

Россия, г.Томск, пер.Кооперативный, 5,634009

E-mail: etugutova@mail.ru

**INVESTIGATION OF FLUORESCENT PROPERTIES OF PLASMA EXOSOMES IN DIAGNOSIS
AND PROGNOSIS OF COLORECTAL CANCER**

E.A. Tugutova, A.I. Knyazkova, A.A. Tsydenova

Scientific Supervisor: Dr. N.V. Yunusova

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,

Russia, Tomsk, Kooperativni str., 5, 634009

E-mail: etugutova@mail.ru

***Abstract.** Exosomes of blood plasma were studied using multiphoton tomography (two-photon microscopy). Exosomes were isolated in patients with colorectal cancer and in healthy donors. Images of fluorescence of exosomes were obtained at a wavelength of 760 nm and second harmonic generation at a wavelength of 380 nm. As a result of the analysis of the obtained data, qualitative differences were found between samples from patients with colorectal cancer and healthy donors.*

Введение. В структуре онкологической заболеваемости Российской Федерации и смертности от злокачественных новообразований колоректальный рак занимает третье место. Неуклонный рост заболеваемости и смертности населения от колоректального рака, высокий процент местнораспространенных и метастатических форм делает актуальным вопрос диагностики и прогнозирования данного заболевания. Поскольку в крови онкологических больных присутствуют экзосомы (внеклеточные везикулы размером 30-100 нм), секретируемые опухолевыми клетками и несущие в своем составе биополимеры, характерные для родительских клеток, эти везикулы все чаще используют в качестве материала для «жидкой биопсии» опухолей. На данный момент исследование экзосом для диагностики и мониторинга опухолевого роста является перспективным направлением в онкологии. Это важно, как для первичной диагностики, так и для контроля метастатических процессов [1, 2].

Материалы и методы. В исследование включены 15 больных колоректальным раком (T2-4N1-2M1) и 6 здоровых доноров. Материалом для исследования служили образцы крови после забора путем венепункции. Экзосомы из плазмы крови были выделены методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием [3]. Образцы выделенных экзосом были охарактеризованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и проточной цитометрии [4]. Визуализация флуоресценции экзосом на длине волны 760 нм и генерации второй гармоники на длине волны 380 нм выполнена на мультифотонном томографе MPTflex (JenLab, Germany).

Результаты. Концентрация экзосом и их флуоресценция на длине волны 760 нм существенно отличались для случаев метастатического, местно-распространенного колоректального рака и образцов здоровых доноров (рис. 1). Аналогичная картина наблюдалась при исследовании всех образцов из взятой нами выборки.

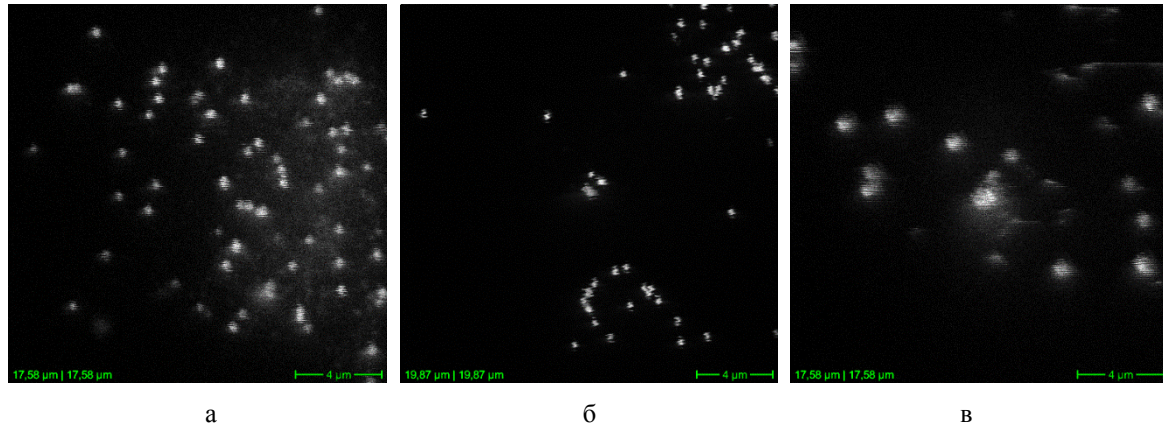


Рис. 1. Флуоресценция экзосом плазмы крови больного метастатическим колоректальным раком (а), местно-распространенным колоректальным раком (б) и здорового донора (в)

Ниже представлены изображения генерации второй гармоники экзосом плазмы крови на длине волны 380 нм для случаев метастатического, местно-распространенного колоректального рака и здорового донора (рис. 2), снятые одновременно с изображениями флуоресценции на длине волны 760 нм в той же области пространства.

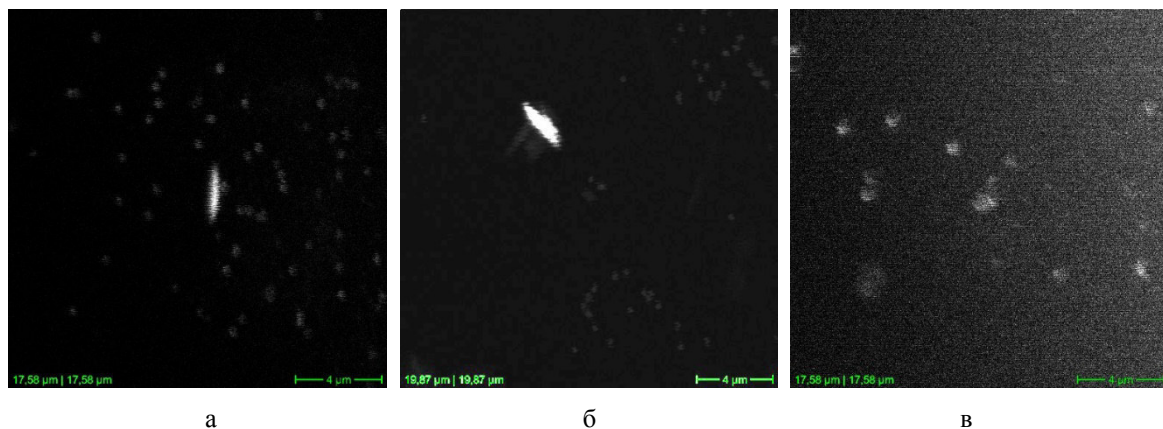


Рис. 2. Генерация второй гармоники экзосом плазмы крови больного метастатическим колоректальным раком (а), местно-распространенным колоректальным раком (б) и здорового донора (в)

При сравнении изображений флуоресценции и генерации второй гармоники выявлено, что не все флуоресцирующие экзосомы видны на изображениях генерации второй гармоники и наоборот. Следовательно, с помощью данных изображений можно различить несколько типов экзосом.

Для хранения выделенных экзосом используется фосфатно-солевой буфер (PBS), поэтому необходимо также проанализировать изображения флуоресценции и генерации второй гармоники для буферной жидкости (рис. 3).

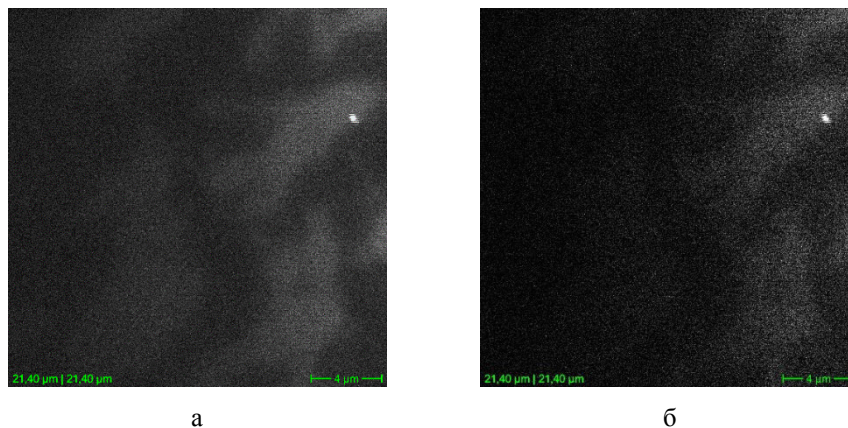


Рис.3. Флуоресценция (а) и генерация второй гармоники (б) фосфатно-солевого буфера (PBS)

При сравнении изображений флуоресценции и генерации второй гармоники с соответствующими изображениями для буферной жидкости выявлено, что экзосомы обладают достаточно сильной флуоресценцией, а также отображаются на изображении генерации второй гармоники.

Выводы. В результате анализа полученных данных обнаружены качественные различия флуоресценции экзосом плазмы крови для случаев метастатического, местно-распространенного колоректального рака и здоровых доноров. Таким образом, двухфотонная микроскопия экзосом плазмы крови является перспективным направлением в диагностике и прогнозе колоректального рака.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Томской области в рамках научного проекта №18-415-703006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Юнусова Н.В., Тамкович С.Н., Кондакова И.В. Экзосомы в различных биологических жидкостях: состав и функции // Молекулярная медицина. – 2017. - Т. 15. - № 4. – С. 14-22.
2. Юнусова Н. В., Кондакова И. В., Коломиец Л. А., Молчанов С. В. Протеасомы и экзосомы при раке яичников: связь с особенностями клинического течения и прогнозом // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 4. – С. 53-59.
3. Tamkovich, S.N., Yunusova, N.V., Stakheeva, M.N., Somov, A.K., Frolova, A.Y., Kirushina, N.A., Afanasyev, S.G., Grigoryeva, A.E., Laktionov, P.P., Kondakova, I.V. (2017). Isolation and characterization of exosomes from blood plasma of breast cancer and colorectal cancer patients. *Biochemistry. Suppl. Series B: Biomedical Chemistry*, V. 11, no. 3, pp. 291-295.
4. Yunusova, N.V., Tamkovich, S.N., Stakheeva, M.N., Grigor'eva, A.A., Somov, A.K., Tugutova, E.A., Kolomiets, L.A., Molchanov, S.V., Afanas'ev, S.G., Kakurina, G.V., Choinzonov, E.L., Kondakova, I.V. (2017, September). The characterization of exosomes from biological fluids of patients with different types of cancer, V. 1882, Issue 1. Retrived October 10, 2017, from <http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.5001659>

**ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ДНК-МАРКЕРЫ ПРИ МОНИТОРИНГЕ РАКА ЛЁГКОГО: АНАЛИЗ
СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ РЕТРОЭЛЕМЕНТОВ LINE-1**

Л.А.Умарова, А.А. Пономарева

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Н.В. Чердынцева
Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г.Томск, пр. Ленина, 36, 634050

Е-mail: umarova_laura95@mail.ru

**CIRCULATING DNA MARKERS IN MONITORING LUNG CANCER: ANALYSIS OF LINE-1
RETROELEMENT METHYLATION STATUS**

L.A. Umarova, A.A. Ponomaryova

Scientific supervisor: Prof., Dr. N.V. Cherdyntseva
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

Е-mail: umarova_laura95@mail.ru

Abstract. *It is known that the violation of DNA methylation processes is one of the earliest and most common events in malignant tumors. The purpose of this study was to perform a comparative analysis of the methylation level of LINE-1 retroelements in blood cirDNA in patients with lung cancer before treatment and at the stages of dynamic observation after antitumor therapy. The study included 16 patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). The material for the study was venous blood, which was taken before the treatment (10-15 days before the start of treatment), 15-30 days after the end of the last course of non-adjuvant chemotherapy and in the postoperative period for 10-15 days. Analysis of the methylation level of LINE-1 element was performed using a quantitative methyl specific PCR. A linear increase in the methylation index of the LINE-1 fragment in response to antitumor therapy was revealed: after chemotherapy, a statistically significant increase in the methylation index was approximately 2-fold ($p = 0.04$, paired t-test), 1.4 times after operation indicators after chemotherapy ($p = 0.134$, paired t-test). As a result, after combined treatment, the LINE-1 methylation index in cc-cirDNA increased 3-fold compared to the level before treatment ($p = 0.03$, paired t-test). The obtained results indicate the prospectivity of the study on extended samples of lung cancer patients with the significance of the LINE-1 methylation index in blood cirDNA for predicting tumor response to treatment, evaluating the effectiveness of therapy and early detection of relapses.*

Введение. Известно, что при онкологических заболеваниях в составе циркулирующей ДНК (цирДНК) плазмы и цирДНК, связанной с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), накапливаются фрагменты опухолеспецифичных aberrантно-метилованных ДНК, которые являются потенциальными онкомаркерами [1-3]. До сих пор преимущественными мишенями анализа в цирДНК крови были гиперметилованные гены опухолевой супрессии. Однако эти гены представлены в геноме единичными копиями, поэтому непростой задачей является выявление метилованных аллелей в составе цирДНК, концентрация которой в крови невелика и составляет в среднем несколько десятков нанограмм [1, 2]. Поэтому интересным подходом представляется определение статуса метилирования мобильных элементов, которые многократно представлены в геноме человека (от нескольких копий до сотен тысяч

копий) и составляют приблизительно 45% его длины [4]. Самым крупным классом автономных ретроэлементов являются элементы LINE-1, которые составляют до 20% генома млекопитающих [5].

Целью настоящего исследования явилось проведение сравнительного анализа уровня метилирования LINE-1 ретроэлементов в цирДНК крови больных раком легкого до лечения и на этапах динамического наблюдения после противоопухолевой терапии.

Материалы и методы. В исследование было включено 16 пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) ($T_{1-3}N_{0-3}M_0$), проходивших лечение на базе клиники Томского НИИ онкологии в возрасте 48-65 лет. Диагноз морфологически верифицирован. Все больные получали комбинированное лечение в составе 2 курсов неoadъювантной химиотерапии по схеме: паклитаксел 175 мг/м² в/в 1 день + карбоплатин АУС 6 в/в 1 день, с интервалом в 3 недели. Вторым этапом выполнялось хирургическое вмешательство (резекция легкого или пневмонэктомия). Материалом для исследования послужила венозная кровь, которая забиралась до лечения (за 10-15 дней до начала лечения), на 15-30 сутки после окончания последнего курса неадъювантной химиотерапии и в послеоперационный период на 10-15 сутки. Венозную кровь собирали в 0,05 М раствор ЭДТА в фосфатно-солевом буфере (соотношение крови и ЭДТА 1:5). Образцы крови разделяли на плазму и клетки крови, фракцию скп-цирДНК получали последовательной обработкой клеток 5 мМ фосфатным буфером и 0,25% раствором трипсина, как описано ранее [2]. ДНК выделяли из 1 мл плазмы, 3 мл ФБ-ЭДТА и 1 мл трипсиновой фракции с помощью наборов «Blood DNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd.» (Новосибирск, Россия). ДНК из ФБ-ЭДТА и трипсиновой фракций объединяли, полученные суммарные препараты представляют собой скп-цирДНК. Образцы ДНК модифицировали бисульфитом натрия, очищали с помощью наборов для выделения модифицированной ДНК «Bisulfite ssDNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd.» (Новосибирск, Россия). Анализ уровня метилирования LINE-1 элементов проводили с использованием количественной метил-специфичной ПЦР. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0».

Результаты. Проведен анализ корреляции концентрации метилированных фрагментов LINE met и фрагментов LINE Ind в скп-цирДНК, которые рассчитывались в геномах-эквивалентах (ГЭ) на 1 мл крови. Выявлена корреляция значений как до лечения ($r = 0,54$), так и после химиотерапии ($r = 0,72$), после операции ($r = 0,83$) ($p < 0,05$, коэффициент ранговой корреляции Спирмена), что говорит об ассоциации изменений анализируемых показателей при проведении противоопухолевого лечения. Выявлено линейное увеличение индекса метилирования фрагмента LINE-1 в ответ на противоопухолевую терапию: после химиотерапии наблюдалось статистически значимое увеличение индекса метилирования примерно в 2 раза ($p = 0,04$, парный t-тест), после операции в 1,4 раза по сравнению с показателями после химиотерапии ($p = 0,134$, парный t-тест). В итоге после комбинированного лечения индекс метилирования LINE-1 в скп-цирДНК увеличивался в 3 раза по сравнению с уровнем до лечения ($p = 0,03$, парный t-тест).

Одной из задач настоящего исследования явилась оценка характера изменений уровня метилирования LINE-1 в цирДНК крови больных НМРЛ после проведенного лечения. В зависимости от ответа опухоли на неoadъювантную химиотерапию, пациентов разделили на 2 группы – с положительным ответом (частичная регрессия опухоли) и менее выраженным ответом (стабилизация или прогрессия опухоли). Оказалось, что в этих группах увеличение индекса метилирования LINE-1 в скп-

цирДНК на этапах лечения характеризуется разными трендами. Больные с опухолью, умеренно отвечающей на терапию (группа со стабилизацией), показали более выраженное увеличение после химиотерапии, и далее незначительное увеличение после операции (23% - 39% - 45%). Больные с положительным ответом на химиотерапию (группа с регрессией) показали тенденцию к линейному увеличению индекса метилирования LINE-1 в ряду [до лечения – после химиотерапии – после операции] (16% - 28% - 44%).

После проведенной противоопухолевой терапии период наблюдения пациентов составлял не менее 5 лет. Пациенты были разделены на 2 группы: 1 – больные с неблагоприятным прогнозом (рецидивы, отдаленные метастазы) (n = 6) и 2 – больные с благоприятным прогнозом (в отсутствие признаков прогрессирования) (n = 10). Проведен однофакторный анализ общей выживаемости больных НМРЛ в зависимости от порогового значения по методу Каплана-Майера. Пороговое значение соответствовало медиане индекса метилирования LINE-1 в скп-цирДНК, определяемого до лечения. Хотя наблюдается тенденция к различию между группами, статистически значимых различий общей выживаемости в зависимости от индекса метилирования LINE-1 в скп-цирДНК крови в настоящей работе не выявлено (long-rank тест, p = 0,35). Для выявления достоверных различий необходимы исследования на расширенных выборках больных РЛ.

Заключение. Таким образом, в настоящей работе показана значимость увеличения индекса метилирования LINE-1 элементов в циркулирующей ДНК крови для мониторинга состояния больных РЛ после проведенного комбинированного лечения. Тренды изменений индекса метилирования LINE-1 в цирДНК оказались различны в сопоставлении уровня ответа опухоли на химиотерапию, что говорит об интегральной связи этого серологического маркера с патологическим процессом при РЛ. Полученные результаты говорят о перспективности исследования на расширенных выборках больных РЛ значимости индекса метилирования LINE-1 в цирДНК крови для прогноза ответа опухоли на лечение, оценки эффективности терапии и раннего выявления рецидивов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rykova E.Y., Morozkin E.S., Ponomaryova AA, Loseva EM, Zaporozhchenko IA, Cherdyntseva NV, Vlassov V.V., Laktionov P.P. (2012). Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opin Biol Ther*, no. 5, pp. 141–153.
2. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Skvortsova T.E., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Bryzgalov L.O., Tuzikov S.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. (2013). Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. *Lung Cancer*, no. 81, pp. 397–403.
3. Schwarzenbach H., Nishida N., Calin G.A., Pantel K. (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature Rev Clin Oncol*. no. 11, pp. 145–156.
4. Cedar H, Bergman Y. (2012). Programming of DNA methylation patterns. *Annu Rev Biochem*. no. 81, pp. 97-117.
5. Федоров А.В. Регуляция транскрипции ретротранспозонов LINE-1 млекопитающих // *Цитология*. - 2008. – Т. 50. - № 12. – С. 1011-1022.

**ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ACONITUM BARBATUM PATR. EX PERS. КАК
ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

М.В. Филонова^{1,2}, Е.С. Филоненко¹

Научный руководитель: д.м.н А.А. Чурин, д.х.н Л.Н. Зибарева

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, Томск пр. Ленина, 36, 634050

²Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга,

Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск,

Россия, Томск пр. Ленина, 3, 634028

E-mail: Maria-Caurus7@yandex.ru

**CALLUS CULTURE PRODUCTION OF ACONITUM BARBATUM PATR. EX PERS. AS A SOURCE
OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**

M. V. Filonova^{1,2}, E.S. Filonenko¹

Scientific supervisor: Prof., Dr. A. A. Churin, Prof., PhD L. N. Zibareva

¹National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin Prospekt 36, korp. 1, 634050.

²Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical

Center, Russian Academy of Sciences, Russia, Tomsk, Lenin Prospekt 3, 634028

e-mail: Maria-Caurus7@yandex.ru

Abstract. *Aconitum barbatum Patr. ex Pers. is perennial plant from the Ranunculaceae Juss. family. It is well known and used in traditional Chinese, Tibetan and Mongolian medicine for the treatment of many diseases. Aconitum barbatum is a rare species. The callus culture was obtained from Aconitum barbatum Patr. ex Pers. which is a very rich source of biologically active substances. The optimal conditions for cultivation and chemical analysis were selected for this culture. Chemical analysis showed the presence of phenolic compounds in callus culture of Aconitum barbatum.*

Введение. Борец бородатый (*Aconitum barbatum* Patr. ex Pers.) - многолетнее растение семейства Лютиковые (*Ranunculaceae* Juss). Этот вид используется в традиционной китайской, тибетской и монгольской медицине для лечения заболеваний ревматического происхождения, невралгиях и простуде [1], обладает болеутоляющим [2] и противоопухолевым свойствами [3]. *A. barbatum* хорошо известен, но является редким видом, имеет невысокую численность и ограниченное распространение в Томской области [1].

Спектр фармакологической активности борца бородатого обусловлен содержанием различных групп биологически активных веществ (БАВ). Борец содержит дитерпеновые алкалоиды, такие как – делькозин, ликоктонин, зонгорин, батаконин [4], кордин [2], флавоноиды, в частности барбазид [5]. Получение необходимого количества растительного сырья для выделения БАВ затруднено из-за невысокой численности популяции растений. Введение в культуру борца представляет интерес, так как позволит получить достаточную биомассу в контролируемых условиях, что является явным преимуществом такого способа для получения биологически активных веществ по сравнению с

получением ее из природного сырья. Получение культуры *in vitro* алкалоидоносных растений затруднено, предположительно, из-за выделения ядовитых соединений в питательную среду, которые могут снижать жизнеспособность клеток [6].

Цель настоящего исследования - получить культуру клеток борца бородатого и оценить способность культивируемых клеток к синтезу вторичных метаболитов.

Материалы и методы исследования. Получение каллусной культуры *Aconitum barbatum*. Семена стерилизовали, стратифицировали в холодильнике в течение 2,5 месяцев, далее повторно стерилизовали и проращивали в пробирках с агаризованной питательной средой Мурасиге-Скуга (MS), без добавления гормонов. Стерилизацию каждый раз осуществляли последовательно в 70 % спирте и 0,1 % сулеме, после чего отмывали семена в дистиллированной воде. Каллусную ткань получали из этиолированных проростков, которые разделяли на экспланты и помещали на питательную среду с MS добавлением гормонов 2-4 D (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) и 6-БАП (6-бензиламинопурин). Дальнейшее культивирование осуществляли на среде MS добавлением гормонов α -НУК (α -нафтилуксусная кислота) и 6-БАП, с пересадкой на свежую среду каждые 20 дней.

Методы исследования БАВ. Анализ содержания БАВ осуществляли в лаборатории фитохимии Сибирского ботанического сада ТГУ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). 1-2 г сырья трехкратно экстрагировали 70 % раствором этанола на водяной бане при 55 °С в течение 12 часов с последующим концентрированием с помощью ротационного испарителя «IKA HB 10 digital» (Германия). ВЭЖХ/УФ анализ выполнен на жидкостном хроматографе «Shimadzu LC-20 AD» (Япония) с диодноматричным детектором. Хроматографическая колонка Perfect Sil Target ODS-3; 4.6 x 250 мм, размер зерна сорбента – 5 μ m, t = 40 °С, элюирование смесью ацетонитрила и изопропилового спирта (5:2) и 0.1 % трифторуксусной кислоты в градиенте от 15 до 35 %, в течение 40 мин. Скорость элюирования – 1 мл/мин. Объем инъекции 5 мкл. Аналитическая длина волны λ_{max} = 272 нм для регистрации флавоноидов, время анализа 60 мин.

Результаты. На кафедре физиологии растений и биотехнологии НИ ТГУ была получена каллусная культура *Aconitum barbatum* Patr. Ex Pers из этиолированных проростков, подобрана питательная среда для получения и культивирования.

В экстрактах дикорастущего и культуры ткани борца бородатого обнаружено большое количество соединения фенольной природы, некоторые данные представлены в таблице (Таблица 1).

Таблица 1

Идентификация БАВ в нативном и экстракте культуры ткани *Aconitum barbatum*

Растительный экстракт		Соединения	Экстракт культуры ткани	
Время удерживания, мин	Макс. длина волны, нм		Время удерживания, мин	Макс. длина волны, нм
5.156	276	салидрозид		
10.371	281, 314		10.513	282
11.207	289, 313		11.481	278
14.317	256, 354		14.065	281
16.536	266, 346		16.625	289
18.233	265, 347		18.001	289
19.232	256, 339	рутин	19.462	289
21.087	266, 315		21.049	287
21.759	268		21.564	286
22.506	265, 343		22.374	289

23.434	265, 341		23.586	286
24.502	254, 328		24.522	286
25.152	267		25.120	286
27.415	268, 318		27.136	282
28.454	268, 321	хризин-7-О-глюкозид	28.536	282
29.052	256, 318		29.379	285
30.189	265, 323		30.010	281
32.558	268		32.561	285
33.807	266, 322		33.720	281
35.463	283, 309		35.583	280
38.075	316, 269		38.190	281

Сравнение хроматографических и спектральных характеристик выявленных соединений и стандартов показало, что в экстракте дикорастущих растений идентифицированы флавоноиды рутин, хризин-7-О-глюкозид и гликозид п-тирозола - салидрозид. В экстракте культуры ткани *Aconitum barbatum* обнаружен ряд простых фенольных соединений. Наличие $\lambda_{\max} = 278-289$ нм в экстракте культуры ткани указывает на синтез фенольных соединений, в структурах которых присутствует одно бензольное кольцо, тогда как для флавоноидов характерно наличие двух максимумов поглощения, соответствующие двум бензольным кольцам. В процессе синтеза флавоноидов объединяются ацетатный и шикиматный пути, в результате которых образуются фенольные соединения с двумя ароматическими кольцами.

Заключение. В результате проведенной работы была получена каллусная культура борца, подобрана питательная среда для ее культивирования. Выявлено, что дикорастущий вид *Aconitum barbatum* богат соединениями полифенольного комплекса, в том числе флавоноидами. Однако в процессе культивирования каллусной культуры борца биосинтез фенольных соединений ограничивается большей частью стадией образования фенолов с одним ароматическим кольцом. Возможно, один из биосинтетических путей, видимо, ацетатный не запускается в условиях *in vitro*, поэтому синтезируются простые полифенолы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Некратова А.Н. Редкие лекарственные растений Томской области и их выращивание // Вестник КрасГАУ. - 2014. - № 5. - С. 88-90.
2. Sun, Li-Mei, Nan, Ze-Dong, Huang, Hong-Li, Li, Wen-Hai, Yuan, Cheng-Shan (2009). Chemical constituents of *Aconitum barbatum* var. *puberulum*. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 45, no. 6, pp. 934.
3. Wada, K., Ohkoshi, E., Zhao, Y., Goto, M., Morris-Natschke, S.L., Lee, K.H. (2015). Evaluation of *Aconitum* diterpenoid alkaloids as antiproliferative agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 25, no. 7. pp. 1525-1531.
4. Batbayar, N., Batsuren, D., Sultankhodzhaev, M. N., Yunusov, M. S. (1988). Alkaloids of *Aconitum barbatum*. Structure of bataconine. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 24, no. 2, pp. 200-202.
5. Pogodaeva, N. N., Fedorov, S. V., Kanitskaya, L. V., Semenov, A. A. (2000). New flavonoid oligoside from *Aconitum barbatum*. Russian Chemical Bulletin, Vol. 49, no. 11, pp. 1905-1909.
6. Мигранова И.Г. Анализ каллусной ткани *Aconitum septentrionale* Koelle: Физиологические и генетические аспекты: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Уфа, 2000. – 102 с.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИЙ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ
МАКРОФАГОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ОТВЕТА НА
ХИМИОТЕРАПИЮ**

Д.С. Халяпин¹, И.В. Ларионова^{1,2}

Научный руководитель: к.м.н. Е.С. Григорьева

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия, г. Томск,
пр. Ленина, 36, 634050

²НИИ онкологии Томского НИМЦ, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

E-mail: daniilkh1997@mail.ru

**COMPARATIVE ASSESSMENT OF SUBSIPOPULATIONS OF TUMOR-ASSOCIATED
MACROPHAGES IN BREAST CANCER DEPENDING ON THE RESPONSE TO CHEMOTHERAPY**

D.S. Khalyapin¹, I.V. Larionova^{1,2}

Scientific Supervisor: Cand.M.Sc, E.S. Grigorieva

¹Laboratory of Translational Cellular and Molecular Biomedicine, Tomsk State University, Lenina Av., 36,
634050 Tomsk, Russia

²Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,
Kooperativny Lane, 5, 634050 Tomsk, Russia

E-mail: daniilkh1997@mail.ru

***Abstract.** The key cells of the immune system that determine the relationship between tumor cells and the microenvironment, beginning with early stages of tumor growth, including regulation of neoangiogenesis and the terminal stage of malignant process, are tumor-associated macrophages (TAM). In the present study, identification of TAM markers in breast tumors in patients with neoadjuvant chemotherapy and a comparative assessment of the differences in the macrophages subpopulation in tumors with different response to chemotherapy were carried out. The data we obtained indicate the functional differences between TAM subpopulations that have various phenotypes, that are confirmed at the level of associative links with the effectiveness of chemotherapy.*

Введение. Современное понимание гетерогенности фенотипических проявлений разных субпопуляций макрофагов указывает на необходимость одновременной оценки нескольких специфичных маркеров, что повышает точность идентификации той или иной субпопуляции макрофагов [1]. Известно, что фенотип M1 или M2 не в полной мере отражает гетерогенность макрофагов и их функциональные особенности. Методы стандартного лечения, таргетные агенты, антиангиогенные препараты и иммунотерапия зависят от функции опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) [2]. Химиотерапия и лучевая терапия могут иметь двойственное влияние на ОАМ, поскольку активированный макрофагами механизм восстановления поврежденной ткани может привести к химиорезистентности [3]. Однако при других обстоятельствах ОАМ имеют решающее значение для эффективной терапии. Поэтому идентификация субпопуляций макрофагов, связанных с ответом на химиотерапию, важна для понимания их роли в химиорезистентности опухолей.

Материалы и методы. В исследование включены больные инвазивным раком молочной железы T1-4N0-3M0, получавших до операции неoadъювантную химиотерапию (НАХТ) по схемам CMF, FAC, CAH. Эффективность предоперационной химиотерапии оценивали по критериям ВОЗ и Международного противоракового союза с помощью УЗИ и/или маммографии. Для исследования использовали парафиновые срезы опухолевой ткани пациенток с РМЖ после курса НАХТ. Были проведены двойные иммунофлюоресцентные окраски с использованием комбинации белковых маркеров: CD68 в комбинации с CD206, CD163, stabilin-1, YKL-40, YKL-39, SI-CLP. Конфокальная микроскопия проводилась с использованием лазерного сканирующего микроскопа CarlZeiss LSM 780 NLO (Германия).

Результаты. В исследовании больные РМЖ со стабилизацией или прогрессированием составляли группу с отсутствием ответа на НАХТ, а больные с полной и частичной регрессией – группу с объективным ответом на лечение. Известно, что CD68 является маркером общей популяции макрофагов, YKL-40 рассматривается в качестве маркера субпопуляции макрофагов 1 типа, индуцированных IFN- γ , YKL-39 - субпопуляции M2 макрофагов, индуцированных IL4+TGF β , SI-CLP - маркера M2 макрофагов. Stabilin-1 (RS1) является маркером дексаметазон-индуцированной субпопуляции макрофагов 2 типа, CD206 экспрессируется на макрофагах 2 типа, индуцированных ИЛ-4. CD163 может экспрессироваться на обоих типах макрофагов и это зависит от микроокружения, в котором они находятся. Нами было обнаружено, что на уровне статистической значимости у пациентов с плохим ответом на НАХТ (стабилизация или прогрессирование) отмечалось большее количество двойных позитивных клеток по маркерам CD68+/CD163+ ($p=0,049$) (Рисунок 1). У пациенток с хорошим ответом на химиотерапию также наблюдалась тенденция к увеличению количества двойных позитивных клеток CD68+/YKL-40+ ($p=0,07$) (Рисунок 2) по сравнению с пациентками с хорошим ответом.

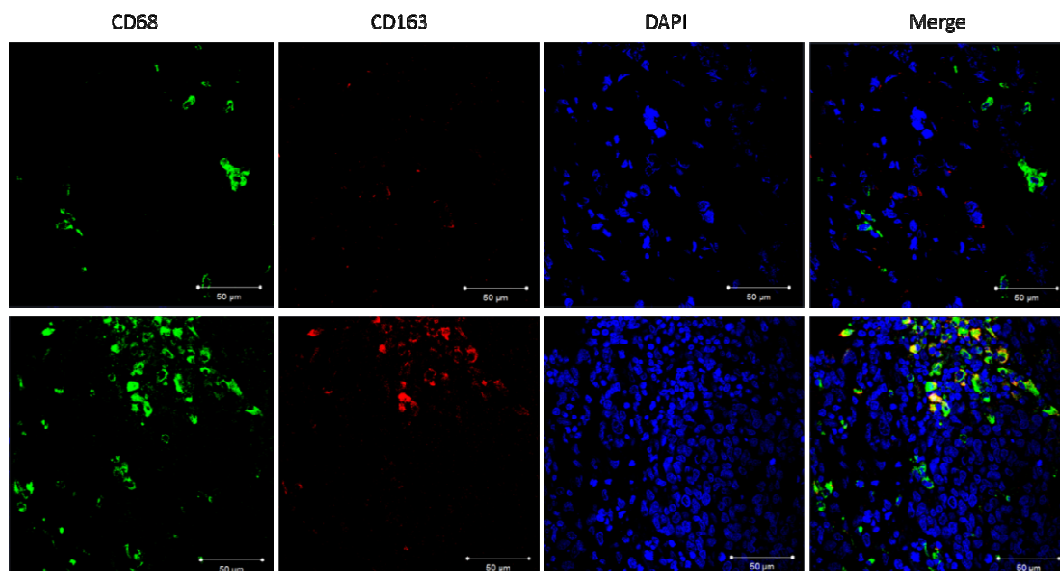


Рис. 1. Конфокальная микроскопия ткани рака молочной железы с хорошим (верхняя панель) и плохим (нижняя панель) ответом на химиотерапию при помощи маркеров CD68 и CD163

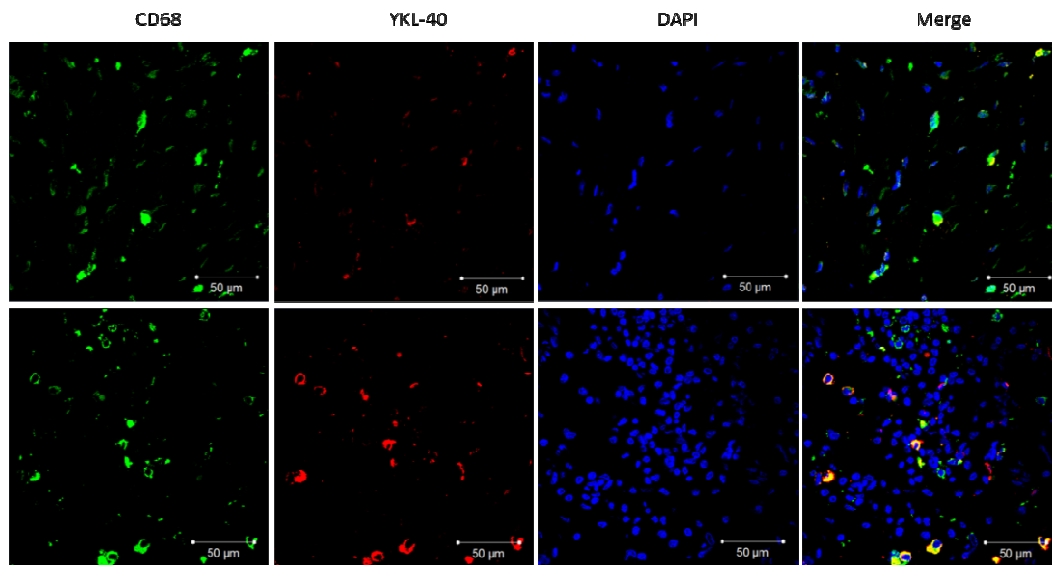


Рис. 2. Конфокальная микроскопия ткани рака молочной железы с хорошим (верхняя панель) и плохим (нижняя панель) ответом на химиотерапию при помощи маркеров CD68 и YKL-40

Выводы. Полученные нами данные свидетельствуют о функциональных различиях субпопуляций опухолеассоциированных макрофагов, имеющих разные фенотипы, что подтверждается на уровне ассоциативных связей с эффективностью химиотерапии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-54-76015 ЭРА_a.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chávez-Galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D., Garcia, I. (2015) Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. *Front Immunology*, no. 6, pp. 263.
2. Mantovani, A., Allavena, P. (2015) The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, no. 212(4), pp. 435–445.
3. Mitrofanova, I., Zavyalova, M., Telegina, N., Buldakov, M., Riabov, V., Cherdyntseva, N., Kzhyshkowska, J.. (2016) Tumor-associated macrophages in human breast cancer parenchyma negatively correlate with lymphatic metastasis after neoadjuvant chemotherapy. *Immunobiology*, no. 222(1), pp. 101-109.

НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА АЛКАЛОИДА Z77 И МЕХАНИЗМЫ ИХ РАЗВИТИЯ

А.В. Чайковский Г.А. Просекин

Научный руководитель: профессор РАН, д.м.н. Г.Н. Зюзьков

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634028

E-mail: thav_pharm@mail.ru

NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF ALKALOID Z77 AND THE MECHANISMS OF THEIR DEVELOPMENT

A.V. Chaikovskii, G.A. Prosekin

Scientific Supervisor: PhD G.N. Zyuz'kov

Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences

«E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine»,

Russia, Tomsk, Lenin Ave., 3, 634028

E-mail: thav_pharm@mail.ru

***Abstract.** Psychopharmacological effects of atisine-type diterpene alkaloid Z77 were studied under conditions of experimental posthypoxic encephalopathy. The preparation had a pronounced cerebroprotective effect consisting in normalization of orientation and exploratory behavior and conditioned activity in experimental animals. These changes were accompanied by significant increase in the number of neural stem cells in the paraventricular region of the brain and markedly enhanced production of neurotrophic growth factors by neural tissue microenvironment cells.*

Введение. На сегодняшний день действие нейропротекторных лекарственных средств заключается преимущественно в сохранении, либо в модификации функций сохранившихся в условиях патологии зрелых клеток нервной ткани. Однако в большинстве случаев данная концепция фармакокоррекции является несостоятельной [1, 2]. В связи с этим актуальным представляется разработка принципиально новых патогенетически обоснованных подходов к терапии заболеваний ЦНС и создание оригинальных церебропротекторных средств с принципиально новыми механизмами действия. Существуют также подходы к решению данной проблемы в рамках регенеративной медицины [3-5]. При этом наиболее физиологичным и перспективным подходом клеточной терапии является фармакологическая стимуляция функций эндогенных стволовых клеток путем подражания деятельности естественных регуляторных систем. В ФГБНУ «НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» выявлены алкалоиды, обладающие стимулирующим влиянием на функции прогениторных клеток различных классов [6]. При этом нами был выделен diterпеновый алкалоид Z77 атизинового типа и выявлена его выраженная активность в отношении мезенхимальных клеток-предшественников.

Цель исследования: на модели ишемического инсульта изучить церебропротекторные свойства алкалоида Z77 и вскрыть его влияние на нейральные стволовые клетки.

Материалы и методы: эксперименты выполнены на крысах линии CD и мышах линии СВА. Экспериментальной моделью являлась полуторная перевязка сонных артерий. Алкалоид в виде 0,025% раствора вводили ежедневно в течение пяти дней. На третий день введения (второй после операции) вырабатывали рефлекс пассивного избегания темного пространства. На пятый день регистрировали двигательную активность в открытом поле, проверяли наличие условного рефлекса пассивного избегания темного пространства и производили забор ткани головного мозга для гистологического исследования. Головной мозг фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин и делали срезы толщиной 4-5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали световой микроскопией. В условиях *in vitro* с помощью метода клонирования определяли влияние алкалоида на содержание нейральных стволовых клеток в паравентрикулярной области головного мозга и продукцию нейротрофинов глиальными клетками.

Результаты: в результате проведенных исследований было установлено, что у животных с экспериментальной ишемией отмечалось резкое повышение уровня ориентировочно-исследовательского поведения в открытом поле. Введение алкалоида Z77 приводило практически к полной нормализации исследуемых показателей. При гистологическом исследовании имели место выраженные нарушения цитоархитектоники нервной ткани головного мозга у животных в постинсультном периоде, которые в значительной степени корригировались алкалоидом. Указанные изменения наблюдались на фоне возрастания содержания нейральных клеток-предшественников в паравентрикулярной области головного мозга экспериментальных животных и повышения выработки нейротрофных факторов элементами микроокружения нервной ткани.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о наличии выраженной церебропротекторной активности у алкалоида Z77, связанной с активацией функций резидентных стволовых клеток головного мозга.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для молодых российских ученых – докторов наук МД-3096.2015.7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V. et al. (2011). Effect of hyaluronidase immobilized using electron-beam synthesis nanotechnology on sensitivity of progenitor cells to regulatory factors. Bull. Exp. Biol. Med. 2011, no. 151 (1), pp. 150-153.
2. Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V. et al. (2011). Pharmacological properties of granulocytic colony-stimulating factor pegylated using electron beam synthesis nanotechnologies. Bull. Exp. Biol. Med., no. 152 (1), pp. 133-137.
3. Чайковский А.В., Зюзьков Г.Н. Механизмы регенераторного действия детерпеновых алкалоидов Аконита байкальского // Сибирский онкологический журнал. -2013. -№ 1. -С. 94.
4. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Суслов Н.И., Ставрова Л.А., Сотникова Н.В. Психофармакологические эффекты гранулоцитарного КСФ и их механизмы при гипоксии высокой степени тяжести // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2005. – № 4., Т. 139. – 367-370.
5. Зюзьков Г.Н., Суслов Н.И., Поветьева Т.Н., Нестерова Ю.В., Афанасьева О.Г., Удут Е.В., Мирошниченко Л.А., Симанина Е.В., Полякова Т.Ю., Ставрова Л.А., Чайковский А.В., Кульпин П.В., Удут В.В., Дыгай А.М., Жданов В.В. Психифармакологические эффекты ингибитора JNK в

условиях постгипоксической энцефалопатии и механизмы их развития // Бюл. exper. биол. - 2017. - Т. 163, № 1. - С. 23-27.

6. Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V., Miroshnichenko L.A. et al. (2013). Mechanisms of hemostimulating effect of *Aconitum baicalense* diterpene alkaloids. Bull. Exp. Biol. Med., no. 155 (3), pp. 350-353.

**ВЛИЯНИЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА НА ГЕМОДИНАМИКУ,
РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ И ВАЗОДИЛАТАТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ
ЭНДОТЕЛИЯ У КРЫС SHR В ПЕРИОД РАЗВИТИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ**

А.Ю. Шаманаев

Научный руководитель: профессор, д.б.н. М.Б. Плотников

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга,
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634028
E-mail: shamanaev7@mail.ru

**EFFECTS OF PENTOXIFYLLINE ON BLOOD PRESSURE, HEMORHEOLOGICAL PARAMETERS,
AND ENDOTHELIAL FUNCTION IN YOUNG SHRS DURING DEVELOPMENT OF ARTERIAL
HYPERTENSION**

A.Y. Shamanaev

Scientific Supervisor: Prof., PhD M.B. Plotnikov

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical
Center, Russian Academy of Sciences,
Russia, Tomsk, Lenin ave., 3, 634028
E-mail: shamanaev7@mail.ru

***Abstract.** The present study was aimed to investigate the effect of pentoxifylline (PTX) administration on arterial pressure, rheological parameters of blood, and endothelial function in SHR during the development of arterial hypertension. SHR were treated intragastrically with PTX at a dose of 100 mg/kg for 6 weeks. It was shown that administration of PTX limited the blood pressure increase and attenuated the severity of hyperviscosity syndrome in hypertensive animals.*

Введение. Согласно современным представлениям, повышение вязкости крови вносит большой вклад в появление и прогрессирование артериальной гипертензии (АГ) [1]. Исходя из этого, существует потенциальная возможность снижать ОПСС и, следовательно, артериальное давление (АД), с помощью средств, прямо влияющих на реологические свойства крови, однако данные о таких исследованиях весьма ограничены. Среди лекарственных веществ с наиболее доказанной гемореологической активностью выделяется пентоксифиллин (ПФ) [2]. В нашей предыдущей работе, было показано, что ПФ способен улучшать гемореологические параметры у крыс SHR в стабильный период АГ [3]. Однако ПФ не оказывал никакого влияния на гемодинамические параметры, а именно артериальное давление (АД), сердечный выброс и ОПСС. В связи с этим, целью настоящего исследования было оценить эффект курсового введения ПФ на АД и гемореологические параметры у молодых крыс SHR в период развития АГ, т.е. в возрасте когда еще не наблюдается значительного ремоделирования сердца и сосудов.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на нормотензивных крысах линии Wistar-Kyoto (WKY) и крысах со спонтанной артериальной гипертензией (SHR). Содержание животных

осуществлялось в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Крысы WKY и SHR включали в эксперимент после достижения возраста 5 недель.

Крысы SHR (n=20) были рандомизированно разделены поровну на контрольную и опытную группы. Крысам SHR опытной группы вводили пентоксифиллин в дозе 100 мг/кг внутривенно в 1% крахмальной слизи ежедневно в течение 6 недель. Крысы WKY и крысы SHR контрольной группы получали эквивалентное количество крахмальной слизи по той же схеме. Последнее введение веществ осуществляли за 3 часа до измерения исследуемых показателей.

Методы измерения гемодинамических и гемореологических параметров подробно изложены ранее [3]. Кратко: систолическое давление (СД) измеряли с использованием хвостовой манжеты, вязкость крови и плазмы – на ротационном вискозиметре, гематокрит – центрифугированием крови в стеклянных капиллярах, агрегацию и деформируемость эритроцитов – на автоматическом анализаторе методами силлектометрии и эктацитометрии соответственно. Индекс вазодилатирующей активности (ИВА) определяли по соотношению реакций АД на эндотелий-зависимый и эндотелий-независимый стимулы.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ «Statistica 6.0». Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали непараметрический критерий «Mann–Whitney U-test».

Результаты и обсуждение. В исследуемый период у крыс SHR наблюдался прогрессивный рост артериального давления. Значения систолического давления у крыс SHR на 11 неделе жизни были достоверно выше на 68% по сравнению со значениями у нормотензивных крыс линии WKY (таблица). При этом в группе животных, получавших ПФ, СД к концу эксперимента было достоверно ниже на 19% по сравнению с контролем.

Таблица 1

Влияние курсового внутривенного введения пентоксифиллина (ПФ) на систолическое давление (СД, мм рт. ст.), гематокрит (Ht, %), вязкость плазмы (ВП, мПа·с), полупериод агрегации эритроцитов ($T_{1/2}$, с), индекс вазодилатирующей активности (ИВА) эндотелия, индекс элонгации при различных напряжениях сдвига (ИЭ, усл. ед.) у крыс SHR в период развития АГ

Группа	СД	Ht	ВП	$T_{1/2}$	ИВА	ИЭ		
						1 Pa	7 Pa	20 Pa
WKY, n=10	124±4	44±1	1,07±0,01	12,5±2,3	0,50±0,04	0,229±0,004	0,472±0,002	0,537±0,006
SHR, n=10	208±11*	48±1*	1,13±0,02*	10,9±0,9	0,36±0,02*	0,196±0,004*	0,459±0,002*	0,517±0,002*
SHR+ ПФ, n=10	168±6*	49±1*	1,15±0,01*	11,2±1,4	0,35±0,02*	0,209±0,006	0,466±0,002 ⁺	0,526±0,002 ⁺

* – достоверные различия по сравнению со значениями у крыс WKY ($p < 0,05$); ⁺ – достоверные различия по сравнению со значениями у крыс SHR ($p < 0,05$).

Комплекс гемореологических нарушений, наблюдаемых у крыс SHR контрольной группы к концу периода возрастания АД, свидетельствует о развитии у них состояния гипервязкости крови с достоверным повышением гематокрита, вязкости плазмы и вязкости крови на всех скоростях сдвига, а также ухудшением деформируемости эритроцитов (табл. 1, рис. 1).

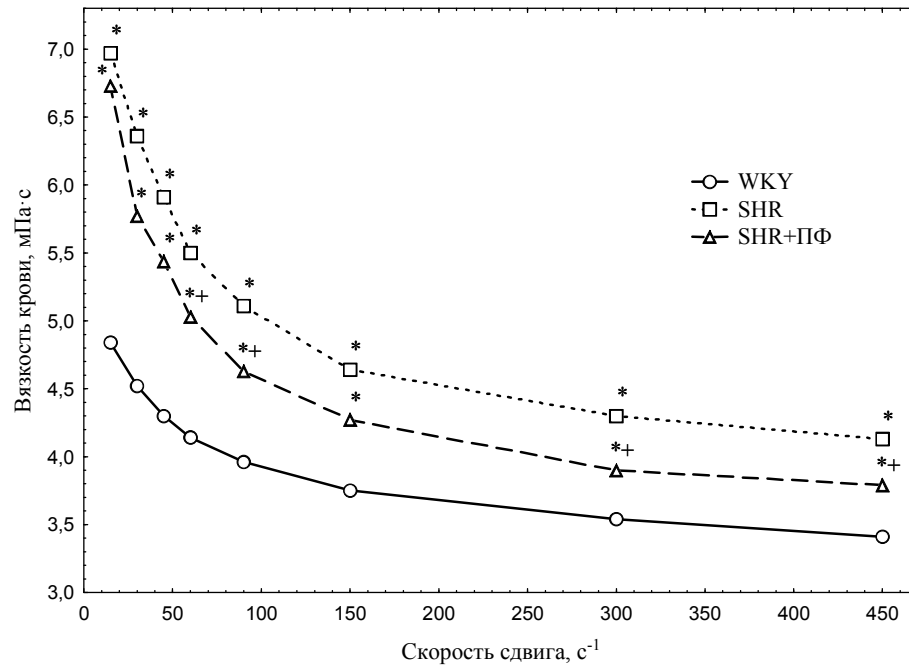


Рис.1. Влияние курсового внутривенного введения пентоксифиллина (ПФ) на вязкость цельной крови у крыс SHR в период развития АГ. * – достоверные различия по сравнению со значениями у крыс WKY ($p < 0,05$); + – достоверные различия по сравнению со значениями у крыс SHR ($p < 0,05$)

У крыс, получавших ПФ, вязкость крови в диапазоне скоростей сдвига 60–450 с⁻¹ была достоверно ниже на 4–6% по сравнению с контролем (рисунок). Курсовое введение ПФ не влияло на уровень гематокрита, вязкость плазмы и показатель агрегации эритроцитов $T_{1/2}$. При исследовании деформируемости эритроцитов в этой группе было выявлено ее достоверное повышение на 1,5–1,7% в зависимости от напряжения сдвига. Значение ИВА было достоверно снижено у контрольных крыс SHR на 28% по сравнению с нормотензивными животными, при этом введение ПФ не оказывало заметного влияния на функциональность эндотелия.

Заключение. Результаты работы продемонстрировали эффективность введения ПФ как средства, ограничивающего рост АД и снижающего тяжесть синдрома гипервязкости крови у крыс SHR в период развития АГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meiselman H.J., Baskurt O.K. (2006). Hemorheology and hemodynamics: Dove andare? Clin Hemorheol Microcirc, no. 1–2, pp. 37–43.
2. McCarty M.F., O’Keefe J.H., DiNicolantonio J.J. (2016). Pentoxifylline for vascular health: a brief review of the literature. Open Heart, no. 1, pp. 000365.
3. Plotnikov M.B., Aliev O.I., Nosarev A.V., Shamanaev A.Y., Sidekhmenova A.V., Anfinogenova Y. D., Anishchenko A.M., Pushkina E.V. (2016). Relationship between arterial blood pressure and blood viscosity in spontaneously hypertensive rats treated with pentoxifylline. Biorheology, no. 2, pp. 93–107.

ВЛИЯНИЕ ОПТИЧЕСКОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ НА ФОТОСШИВАНИЕ СКЛЕРЫМ.Е. Швачкина

Научный руководитель: доцент, к.х.н. А.Б. Правдин

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.

Чернышевского,

Россия, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, 410012

E-mail: marevesh@mail.ru

INFLUENCE OF OPTICAL CLEARING ON COLLAGEN CROSSLINKING OF SCLERAM.E. Shvachkina

Scientific Supervisor: Associate Professor at the Department of Optics and Biophotonics A.B. Pravdin

Saratov State University, Russia, Saratov, Astrakhanskaya str., 83, 410012

E-mail: marevesh@mail.ru

***Abstract.** This work is devoted to the study of the influence of optical clearing of sclera by hyperosmotic agents on formation of collagen crosslinks in the thickness of the sclera induced by 0,1% riboflavin solution and ultraviolet radiation at 370 nm wavelength. Using optical coherence tomography (OCT), the cross-section area of porcine sclera specimens during optical clearing were determined. Based on the obtained data, the optimal time intervals between the application of the immersion agent and UV-irradiation during photo-crosslinking were defined. The estimate of collagen photo-crosslinks distribution in the cross section of the specimen in non-clearing and optically clearing sclera samples ex vivo was performed using a multiphoton tomograph MPTflex.*

Введение. В наше время одним из основных заболеваний, приводящих к нарушению зрения, является близорукость, серьезной формой которой является прогрессирующая миопия, характеризующаяся растяжением склеры [1]. Перспективным методом лечения прогрессирующей миопии, не предполагающим внедрение инородных тел в организм, является коррекция механических свойств склеры задней поверхности глазного яблока посредством фотовоздействия, приводящего к образованию дополнительных ковалентных связей между молекулами коллагена внутри склеры (фотосшивание коллагена), с использованием рибофлавина в качестве сенсibilизатора и ультрафиолетового излучения. Ультрафиолетовое фотосшивание склерального коллагена повышает жесткость склеры и улучшает ее механические свойства, способствуя стабилизации патологического процесса (замедляя или даже останавливая патологические изменения) при прогрессирующей миопии, что доказано в экспериментах на мелких лабораторных животных [2]. В то же время, в литературе [3] отмечается недостаточная эффективность существующих методик кросслинкинга коллагена для склеры человека, что можно связать с сильным рассеянием ультрафиолетового излучения биотканью, ослабляющим эффективность фотовоздействия в толще ткани. Увеличить глубину проникновения ультрафиолетового излучения в биоткань позволяет метод иммерсионного оптического просветления [4-7]. Нанесение иммерсионных агентов на склеру перед процедурой фотосшивания может увеличить эффективность данного метода и уменьшить дозу ультрафиолетового облучения, делая процедуру более безопасной. Ранее было показано [8], что сенсibilизированное фотовоздействие в условиях оптического

иммерсионного просветления приводит к большему увеличению жесткости образцов склеры *ex vivo*. В литературе, в частности в [7], было отмечено уменьшение площади образца соединительной ткани (образованной сеткой пересекающихся коллагеновых пучков) при действии иммерсионных просветляющих агентов. В работе [9] показано, что модифицированные в результате действия гиперосмотического иммерсионного агента оптические свойства дермы сохраняются после регидратации образца, если последний был подвергнут в просветленном состоянии химическому сшиванию коллагена. В свете этого ожидается, что иммерсионное воздействие просветляющих агентов на заднюю поверхность склеры приведет к сокращению поверхности склеры, то есть к купированию растяжения склеры при развитии миопии, а фиксация такого сжатого состояния путем образования сшивок позволит не только замедлить развитие миопии, но и уменьшить уже развившиеся к моменту воздействия растяжение (изменение формы) задней стенки, и тем самым осуществить не только стабилизирующий, но и терапевтический эффект. Целью настоящего исследования было определение оптимального времени воздействия иммерсионным агентом для достижения максимального сокращения склеры и изучение с помощью многофотонной томографии распределения по глубине склеры коллагеновых УФ-фотосшивок в непросветленных и оптически просветленных образцах склеры *ex vivo*.

Материалы и методы. В работе действие иммерсионного агента на геометрические размеры образцов свиной склеры оценивалось по изменению поперечного сечения образца в процессе просветления, которое контролировалось с помощью оптического когерентного томографа ThorLabs GANYMEDE-II. В качестве просветляющего иммерсионного агента использовался 88% водный раствор глицерина. По полученным данным было определено, что наибольшее уменьшение поперечного сечения ткани происходит за 20 минут с момента погружения образцов в иммерсионную жидкость.

Для изучения влияния оптического просветления на эффективность методики образования сшивок, описанной в работах [2,3] были сравнены изображения сигналов двухфотонно возбуждаемой автофлуоресценции и второй гармоники, полученные с помощью многофотонного томографа MPTflex, образца свиной склеры, обработанного 0,1% раствором рибофлавина в течение 20 минут и ультрафиолетовым излучением длиной волны 370 нм в течение 30 минут и образца склеры (обработанного 0,1% раствором рибофлавина), просветленного 88% раствором глицерина 20 минут, а затем подвергнувшегося УФ облучению.

Результаты. На рисунке 1 представлены изображения сигналов двухфотонно возбуждаемой автофлуоресценции и второй гармоники образцов склеры в нативном состоянии, после фотосшивания и образца, предварительно просветленного перед фотосшиванием на глубине 5, 15 и 50 мкм. Основываясь на том, что эластин и поперечные связи между фибриллами коллагена являются основными источниками автофлуоресценции, по полученным данным были сделаны выводы о том, что при предварительном просветлении коллагеновые фотосшивки образуются на большей глубине.

Заключение. Было определено оптимальное время воздействия 88% водным раствором глицерина на образцы свиной склеры для достижения максимального сжатия и получены изображения сигналов двухфотонно возбуждаемой автофлуоресценции и второй гармоники в непросветленных и оптически просветленных образцах склеры *ex vivo* на разной глубине с помощью многофотонной томографии.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект №17-32-50190).

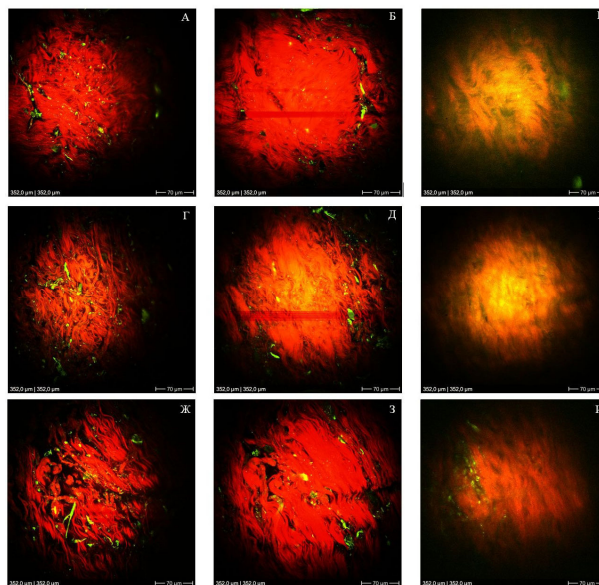


Рис. 1. Изображения образцов склеры свиной на разной глубине, полученные с помощью мультифотонного томографа А-В – в нативном состоянии, Г-Е – после воздействия раствором рибофлавина и ультрафиолета, Ж-И – после воздействия раствором рибофлавина, просветления раствором глицерина и облучения ультрафиолетом. Красным изображен сигнал второй гармоники, зеленым – сигнал двухфотонно возбуждаемой автофлюоресценции

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morgan, I. G., Ohno-Matsui, K., Saw, S. M. (2012). Myopia. The Lancet, no. 9827, pp. 1739-1748.
2. Wollensak, G., Iomdina, E. (2009). Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA). Acta ophthalmologica, no. 2, pp. 193-198.
3. Zhang, Y., Li, Z., Liu, L., Han, X., Zhao, X., Mu, G. (2014). Comparison of Riboflavin/Ultraviolet-A Cross-Linking in Porcine, Rabbit, and Human Sclera. BioMed Research International, no. 2014, pp. 1-5.
4. Генина Э. А., Башкатов А. Н., Синичкин Ю. П., Тучин В. В. Оптическое просветление склеры глаза in vivo под действием глюкозы // Квантовая электроника. – 2006. – Т. 36. – №. 12. – С. 1119-1124.
5. Tuchin, V.V. (2006). Optical clearing of tissues and blood. Bellingham: Spie Press. J. of Biomedical Photonics & Eng., no. 1(1), pp. 22-58.
6. Zhu, D., Larin, K.V., Luo, Q., Tuchin, V.V. (2013). Recent progress in tissue optical clearing. Laser & photonics reviews, no.5, pp. 732-757.
7. Тучина Д. К., Генин В.Д., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. Оптическое просветление тканей кожи ex vivo под действием полиэтиленгликоля // Оптика и спектроскопия. – 2016. – Т.120. – №.1. – С. 36-45.
8. Швачкина М. Е., Правдин А. Б. Об использовании оптического просветления при укреплении склеры // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. – 2015. – Т. 15. – №. 4. – С. 37-41
9. Tanaka, Y., Shi, D., Kubota, A., Takano, Y., Fuse, N., Yamato, M., Okano, T., Nishida, K. (2011). Irreversible optical clearing of rabbit dermis for autogenic corneal stroma transplantation. Biomaterials, no.28, pp. 6764-6772.

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ГОМЕОСТАТИЧЕСКОЙ
ПРОЛИФЕРАЦИИ НА Т-РЕГУЛЯТОРНЫЕ КЛЕТКИ *IN VITRO***

Д.В. Шевырев

Научный руководитель: Академик РАН, профессор, д.м.н. В.А. Козлов
Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии
Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14, 630099
E-mail: dr.daniil25@mail.ru

***IN VITRO* EVALUATION OF INFLUENCE OF HUMORAL FACTORS OF HOMEOSTATIC
PROLIFERATION ON T-REGULATORY CELLS**

D.V. Shevyrev

Scientific supervisor: Academician of RAS, MD, Prof., V.A. Kozlov
Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
Russia, Novosibirsk, Yadrintsevskaya str., 14, 630099
E-mail: dr.daniil25@mail.ru

Abstract. *Role of T-regulatory cells (Treg) in pathogenesis of different autoimmune diseases is widely known. A lot of studies have been dedicated to contribution of these cells in development of rheumatoid arthritis. It was shown that different abnormalities of these cells such as quantitative or qualitative may lead to beginning and progression of autoimmune pathology. At the same time some authors note the importance of homeostatic proliferation (HP) in beginning of autoimmune diseases. HP is normal physiological process caused by lymphopenia to support constant level of T cells. However, HP can make some negative contribution. This process accompanied by decrease of T-cell receptor (TCR) repertoire and selection of T-cell clones with relatively high affinity to selfantigens. In common this may increase the risk of development of autoimmune pathology. However, impact of homeostatic proliferation on Treg cells is not completely understood. In this study we performed the in vitro assay of influence of the main humoral factors of HP - IL7 and IL15 cytokines on Treg cells. We revealed these factors, especially IL7, can support surviving and stability Treg cells phenotype (by FoxP3 expression) and can increase the expression of functional molecules of Treg cells such as PD-L1 in experiment which was performed on cells obtained from healthy donors blood. So these results reflect the importance of homeostatic proliferation and its humoral factors in not only supporting of conventional T-cells but in influence on T-regulatory cells. It can play significant role in the development of autoimmune diseases. So we are going to continue our investigations with blood from rheumatoid arthritis patients.*

Введение. Ревматоидный артрит (РА) – это тяжелое заболевание соединительной ткани, которое часто приводит к инвалидности и сокращению продолжительности жизни. Основным патогенетическим звеном РА считается персистирующая активация аутореактивных Т-лимфоцитов, которая приводит к усилению продукции цитокинов, активации В-лимфоцитов и макрофагов. Установлено, что активность РА и выраженность повреждения суставов ассоциированы с повышением уровня пролиферации Т-клеток [1]. Однако нет однозначных данных о роли Т-регуляторных клеток (Трег) в этом процессе, которые в норме обеспечивают подавление избыточного иммунного ответа с помощью контактных и гуморальных

механизмов [2]. Во многих исследованиях *in vivo* было показано, что дефекты Treg-звена способствуют развитию аутоиммунных заболеваний и что эти процессы можно предотвратить путем адоптивного переноса функциональных Treg-клеток от здоровых животных [3]. Большинство исследований показывает обратную взаимосвязь между активностью РА и числом Treg-клеток, но эти результаты малочисленны и часто противоречивы [1]. Возможно, такие несоответствия стоит связывать со сложностью выделения данной клеточной популяции, её крайней неоднородностью и нестабильностью некоторых субпопуляций. В развитие РА вносит вклад гомеостатическая пролиферация (ГП) – процесс численного восстановления пула Т-лимфоцитов в условиях лимфопении с участием цитокинов IL-7 и IL-15, в результате которого снижается разнообразие репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) и происходит отбор потенциально аутореактивных Т-лимфоцитов [4]. Это приводит к нарушению периферической аутоагрессивности, которая в норме обеспечивается Treg-клетками. В настоящее время известно, что происходит изменение численности Treg при РА, которое коррелирует с тяжестью заболевания [1, 5]. Однако недостаточно данных о функциональной и пролиферативной активности Treg клеток при повышенных уровнях IL-7 и IL-15 в условиях ГП [6, 7]. Таким образом, целью данной работы стало изучение влияния факторов гомеостатической пролиферации на Treg-клетки *in vitro*.

Материалы и методы. Объектами исследования стали 6 условно здоровых доноров (средний возраст составил 39 лет). Мононуклеарные клетки выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина (1,078 г/мл). При определении оптимальной концентрации цитокинов IL-7 и IL-15 была произведена раститровка доз 10 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл для каждого цитокина в культурах мононуклеарных клеток 5 условно здоровых доноров. Оптимальной считалась доза, вызывающая максимальную пролиферацию Т-клеток. Как IL-7, так и IL-15 достоверно ($p < 0,05$) вызывали максимальный пролиферативный ответ в дозировках 50 нг/мл и 100 нг/мл, при этом между данными концентрациями достоверных отличий не было выявлено. Выбранные концентрации цитокинов в эксперименте составили 50 нг/мл для IL-7 и IL-15, для анти-CD3 антител – 0,5 мкг/мл, для IL-2 – 50 МЕ/мл. Для фенотипирования клеток использовался проточный цитофлуориметр FACS Canto II. Исследование Т-регуляторных клеток проводилось с использованием поверхностных маркеров ($CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$) и транскрипционного фактора FoxP3 ($CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$). Достоверность различий оценивалась с помощью Т-критерия Уилкоксона для зависимых выборок. Статистический анализ проводился с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0».

Результаты. Было достоверно ($p < 0,05$) обнаружено снижение процентного отношения FoxP3⁺Treg-клеток в контрольных лунках без стимуляции в сравнении с образцами до культивирования. Однако при стимуляции цитокинами IL-7 ($p < 0,05$) и совместно IL-7 + IL-15 ($p < 0,05$) относительное количество FoxP3⁺Treg-клеток было достоверно выше, чем в отсутствии стимуляции. При этом не было выявлено достоверных отличий при воздействии на клетки анти-CD3-антителами совместно с IL-2 в сравнении с контролем. Также было обнаружено увеличение уровня экспрессии PD-L1 на $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$ Treg-клетках под влиянием IL-15 ($p < 0,05$) и совместной стимуляции IL-7 + IL-15 ($p < 0,05$). Наибольшее увеличение экспрессии этой молекулы наблюдалось под воздействием анти-CD3-антител и IL-2 ($p < 0,05$). В то же время влияние IL-7 на увеличение экспрессии PD-L1 на Т-регуляторных клетках носило характер тенденции ($p = 0,07$).

Стоит отметить, что использование поверхностных маркеров (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁺) для исследования Т-регуляторных клеток в культурах было осложнено тем фактом, что стимуляция цитокинами вызывала активацию эффекторных клеток, которая сопряжена с увеличением экспрессии рецептора к IL-2R (CD25) и снижением экспрессии рецептора к IL-7 (CD127) на этих клетках. Т.е. часть Т-эффекторных клеток при культивировании могла приобретать фенотип CD25⁺CD127⁺ и вносить некоторую погрешность. Поэтому дальнейшие исследования планируется проводить с использованием сортирования Т-регуляторных и Т-респондерных клеток с последующим окрашиванием соответствующей популяции витальными красителями CFSE и CMTMR для точной идентификации клеток в культурах и оценки их пролиферации.

Выводы. В данном исследовании было показано, что гуморальные факторы ГП способны обеспечивать выживание Трег-клеток через поддержание экспрессии FoxP3 – важного транскрипционного фактора, играющего основную роль в обеспечении функциональной активности Трег-лимфоцитов. Также впервые было показано, что факторы гомеостатической пролиферации, особенно IL-15, способны увеличивать экспрессию молекулы PD-L1 на Трег-клетках, влияя, таким образом, на функциональную активность этих клеток. В свете полученных данных представляется интересным более подробно изучить влияние IL-7 и IL-15 на Трег-клетки, оценивая их пролиферативный ответ, возможность перехода в патогенные exFoxP3 RORγt⁺-клетки, особенно у пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ и бюджета Новосибирской области, грант №17-44-540167.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Насонов Е.Л. Ревматология: Национальное руководство / Каратеев Д.Е, Балабанова Р.М. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2008 – 720.
2. Schmidt A., Oberle N., Krammer P.H. (2012) Molecular mechanisms of Treg-mediated T-cell suppression. *Front Immunol*, v. 3, no. 51, pp. 1-20.
3. Bolton H.A., Zhu E., Terry A.M., Guy T.V., Koh W.P., Tan S.Y., Power C.A., Bertolino P., Lahl K., Sparwasser T., Shklovskaya E., Fazekas de St Groth B (2015) Selective Treg reconstitution during lymphopenia normalizes DC costimulation and prevents graft-versus-host disease. *J Clin Invest*, v. 125, no. 9, pp. 3627–3641.
4. Козлов В.А. Гомеостатическая пролиферация как основа неизбежного формирования тотального иммунодефицита // *Медицинская иммунология*. – 2014 - Т. 16 - №5. – 403-408.
5. Firestein G.S. (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, v. 423, no. 6937, pp. 356–361.
6. Heninger A.K., Theil A., Wilhelm C., Petzold C., Huebel N., Kretschmer K., Bonifacio E., Monti P. (2012) IL-7 abrogates suppressive activity of human CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells and allows expansion of alloreactive and autoreactive T cells. *J. Immunol*, v.189, no. 15, pp. 5649-5658.
7. Tosiek M.J., Fiette L., El Daker S., Eberl G., Freitas A.A. (2016) IL-15-dependent balance between Foxp3 and RORγt expression impacts inflammatory bowel disease. *Nat Commun*, v. 7, Article number: 10888, doi:10.1038/ncomms10888.

**ИЗМЕНЕНИЯ В АКТИВАЦИИ МОТОНЕЙРОННЫХ ПУЛОВ ПОСТУРАЛЬНО-
ТЕТАНИЧЕСКОЙ МУСКУЛАТУРЫ ПРИ ГИПОКСИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ**

А.С. Шилов, Е.А. Уляшева, А.В. Лахтионов

Научный руководитель: чл.-корр. РАН, профессор, д.б.н. И.М. Рощевская
Коми научный центр Уральского отделения РАН,
Сыктывкарский государственный университет имени Питирима Сорокина
Россия, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 24, 167982

E-mail: s.shilov@icloud.com

**ACTIVATION CHANGES OF POSTURAL-TETANIC MUSCLE MOTONEURON PULLS AT
HYPOXIC HYPOXIA**

A.S. Shilov, E.A. Ulyasheva, A.V. Lahtionov

Scientific Supervisor: Corr.-Mem. RAS, Prof., Dr. I.M. Roschevskaya
Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Syktyvkar State University named after Pitirim Sorokin

E-mail: s.shilov@icloud.com

***Abstract.** the study results of the possible hypoxia modulating influence on motoneuron pool activity are presented in the paper. Soleus and gastrocnemius muscles with voluntary and passive movement. The unidirectional conditioning of the monosynaptic spinal H-reflex was revealed under non-specific hypoxia effects. Also, after stressful effects, there was a pronounced decrease in the H-reflex depression, which is apparently due to the weakening effect of suprasegmental control systems in the cumulative effect of hypoxic hypoxia.*

Введение. Несмотря на большой опыт научного познания в области высокогорной и экспериментальной гипоксии, многие стороны проблемы адаптивных перестроек функций организма человека под влиянием гипоксических воздействий до сих пор не утрачивают своей научной значимости в экологической, прикладной физиологии и медицине. В этой связи, представляет особый интерес изучение физиологических эффектов интервальных гипоксических воздействий (тренировок), способствующих расширению функциональных возможностей организма и коррекции состояния его физиологических систем.

Многочисленными исследованиями [1, 2, 8] установлено, что интервальные гипоксические воздействия приводят к расширению функциональных резервов кардиореспираторной системы, активизации дыхательного компонента компенсаторных реакций на клеточном и тканевом уровнях. В литературе широко представлены сведения о результирующих эффектах гипоксических воздействий – повышение экономичности функций и физической работоспособности [1, 4], уменьшение латентных периодов простых и сложных сенсомоторных реакций [6], прирост стрессоустойчивости гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы [7, 9], облегчение течения или нормализация некоторых патологических состояний [3].

Вместе с этим, крайне мало работ посвящено изучению влияния гипоксических воздействий на двигательную систему человека. Имеются указания [5] на то, что прекондиционирование гипоксией

приводит к уменьшению порогов Н- и М-ответов *m. soleus*, их амплитуд и нормированного показателя – $H_{max}/M_{max}\%$. При острой гипоксии обнаружена четкая зависимость изменений активности мотонейронного пула и прямого моторного ответа *m. gastrocnemius* от исходных порогов рекрутирования Н-рефлекса [1,]. В условиях гипоксической гипоксии (6 суток – 2850 м и 7 суток – 5050 м над ур. моря) не выявлены изменения латентности, порогов вызова Н- и М-ответов, амплитуды моторных ответов *m. vastus lateralis* и *m. soleus*, но обнаружено повышение возбудимости мотонейронных пулов этих мышц [8]. Близкие результаты получены в других исследованиях, где увеличение амплитуды Н-рефлекса связывается с прямым действием недостатка кислорода на супраспинальные структуры ЦНС. Косвенным аргументом такого предположения являются данные, свидетельствующие о начальной активации (судя по ЭЭГ), переходящей в постепенное понижение возбудимости структур головного мозга, особенно быстро на уровне ретикулярной формации при острой гипоксии у животных. Как известно, ретикулярная формация оказывает специфические тормозные и диффузные облегчающие влияния на спинальную рефлекторную деятельность, в том числе на моносинаптические двигательные рефлексы. Следовательно, априори можно предполагать, что одним из механизмов, определяющих состояние рефлекторной возбудимости мотонейронного пула при гипоксии, является изменение активности центральных регуляторных структур. При этом возможно прямое действие гипоксии на β -адренергическую регуляцию мышечной деятельности, приводящей к понижению теплотворной функции и повышению КПД мышечного сокращения у крыс. Однако в исследованиях на человеке при длительной адаптации к гипобарической гипоксии был показан обратный эффект, т. е. увеличение теплотворной функции мышечной деятельности.

Целью настоящей работы послужило изучение отставленного влияния интервальных нормобарических гипоксических воздействий на функциональное состояние отдельных звеньев моносинаптической рефлекторной дуги и прямой ответ фазической (*m. gastrocnemius*) и тонической (*m. soleus*) мышц голени человека.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на неврологически здоровых мужчинах (19-26 лет), которые были условно разделены на две группы: – I (n=15) подвергались дозированному воздействию (ДВ) интервальными нормобарическими гипоксическими тренировками (ИНГТ) (дыхание воздухом с содержанием O_2 9.9%, CO_2 – 0.03% от 30 до 50 минут в течение 19 дней). Экспозиция ИНГТ состояла из 8-10 повторных циклов 5-минутного дыхания гипоксической газовой смесью, перемежающихся 2-минутными интервалами дыхания воздухом. Другая группа – II (n=16) в течение этого же периода подвергалась ежедневной антиортостатической гипокинезии (АНОГ) – испытуемые лежали вниз головой на кушетке, стоящей под углом -20° в течение 60 минут. В фоновом исследовании и после 19 дней ДВ ИНГТ и АНОГ оценивались временные и амплитудные характеристики рефлекса Хоффманна и М-ответа. Регистрацию Н-рефлекса и М-ответа проводили с помощью нейромышечного анализатора НМА-4-01 «Нейромиан» («Медиком ЛТД»).

Результаты. При анализе влияния ДВ ИНГТ и АНОГ на амплитудные характеристики прямого мышечного ответа выявлены сходные тенденции нарастания амплитуды к 19 дню. Однако в группе II М-ответ *m. soleus* в диапазоне стимуляции от 24 до 34 мА был достоверно ниже ($p<0.01$), что, вероятно, обусловлено влиянием гравитационной разгрузки при АНОГ на фазическую мускулатуру [2]. Следует отметить значимо большие значения амплитуд М-ответов *m. gastrocnemius* в I группе (32-40 мА) и *m.*

soleus (38-46 мА); первый пик M_{max} обеих мышц у представителей I группы определялся при 20 мА, тогда как в группе II М-ответ достигал максимума при супрамаксимальной стимуляции (48-50 мА). При анализе влияния ДВ ИНГТ и АНОГ на активацию мотонейронных пулов «быстрой» икроножной и «медленной» камбаловидной мышц выявлено смещение амплитудных пиков в сторону большей силы стимуляции. I группа: H_{max} m. gastrocnemius – 20 мА, H_{max} m. soleus – 18 мА в фоновом исследовании, после 19 дней ДВ ИНГТ H_{max} m. gastrocnemius – 24 мА, H_{max} m. soleus – 24 мА; II группа: H_{max} m. gastrocnemius – 16 мА, H_{max} m. soleus – 16 мА в фоновом исследовании, после 19 дней ДВ АНОГ H_{max} m. gastrocnemius – 32 мА, H_{max} m. soleus – 26 мА, что косвенно может характеризовать оказываемые неспецифические влияния на активность мотонейронных пулов исследуемых мышц голени как моделирующее.

Выводы. Предварительные результаты исследования показали, что в определенной степени ИНГТ и АНОГ однонаправленно влияют на активацию мотонейронного пула m. soleus и m. gastrocnemius при произвольном движении и движении в экзоскелете. Максимальная активация Н-рефлекса икроножной мышцы происходила в условиях стимуляции большеберцового нерва током средней интенсивности, что может свидетельствовать о повышении порога возбудимости Ia сенсорных волокон после воздействия ИНГТ и АНОГ. Амплитуды максимальных Н-ответов в обеих группах увеличивались при индуцировании электрическим током в диапазоне от 22 до 32-40 мА ($p < 0.05$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коц Я. М. Организация произвольного движения: Нейрофизиологические механизмы. – М.: Наука, 1975. – С. 30-38.
2. Aagaard, P., Simonsen, E., Andersen, J., Magnusson, P., Dyhre-Poulsen, P. (2002). Neural adaptation to resistance training: changes in evoked V-wave and H-reflex responses [Electronic version]. *Journal of Applied Physiology*, no. 92, pp. 2309-2318.
3. Caquelard, F., Burnet, H., Tagliarini, F., Cauchy, E., Richalet, J.P., Jammes, Y. (2000). Effects of prolonged hypobaric hypoxia on human skeletal muscle function and electromyographic events [Electronic version]. *Clinical Science*, pp. 329-337.
4. Lang, A.H., Puusa, A., Hynninen, P., Kuusela, V., Jontti, V., Sillanp, M. (1985). Evaluation of nerve conduction velocity in later childhood and adolescence [Electronic version]. *Muscle & Nerve*, no. 8, pp. 38-43.
5. Lee, J.K., Emch, G.S., Johnson, C.S., Wrathall, J.R. (2005). Effect of spinal cord injury severity on alterations of the H-reflex [Electronic version]. *Experimental Neurology*, no. 196, pp. 430-440.
6. McComas, A. J. (2001). *Skeletal muscle: form and function*. McMaster University, p. 407.
7. Petersen, N., Morita, H., Nielsen, J. (1998). Evaluation of reciprocal inhibition of the soleus H-reflex during tonic plantar flexion in man [Electronic version]. *Journal of Neuroscience Methods*, no. 84, pp. 12-17.
8. Petersen, N.L. Christensen, O.D., Nielsen, J. (1998). The effect of transcranial magnetic stimulation on the soleus H-reflex during human walking [Electronic version]. *Journal of Physiology*, no. 513, pp. 599-610.

ВЛИЯНИЕ МАКРОФАГОВ НА ПРОЦЕСС ДЕГРАДАЦИИ ПОЛИМЕРА

А.С. Шляхтун, Е. Шаповалова

Научный руководитель: Д. м. н., профессор Чурина Елена Георгиевна

Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: lonelynw59@gmail.com

THE EFFECT OF MACROPHAGES ON POLYMER DEGRADATION

Shlyahatun A.S., Shapovalova Ye.

Scientific Supervisor: Prof., Dr. Churina Ye. G.

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

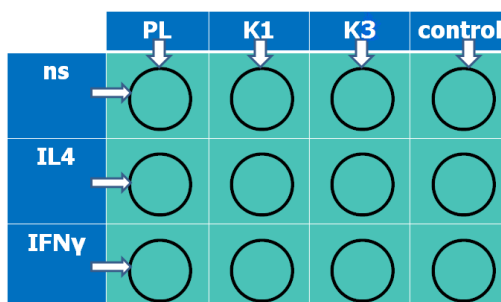
Lenina avenue, 36, 634050

E-mail: lonelynw59@gmail.com

Abstract. *Nowadays researches devoted to implantation are of great interest. The more attention is paid to methods of investigation of implants' biocompatibility and, in case of biodegradable implants, of lasting of degradation process. Both of these factors are determined with organism's immune response provided by the system of mononuclear phagocytes, starting from monocytes, and among them especially macrophages that rule the processes of inflammation and degradation of xenogenous material. Knowledge of macrophages' reaction on the object allows to evaluate the opportunities of using the material in living organisms and, for biodegradable implants, time of decomposition under in vivo conditions. The aim of the study was to investigate an influence of macrophages, stimulated in different ways, on the process of degradation of biodegradable polymer polylactide (pure and in composition with hydroxiapatite with 90 and 70 percent of polylactide, respectively) by examining the decrease of polymer's molecular weight. The result was supposed to show the dependence of molecular weight's decrease on different types of macrophages' stimulation.*

Введение. В биомедицинских исследованиях активно развиваются направления, связанные с имплантацией и протезированием, ведется постоянный поиск и разработка новых материалов, способных как можно более полноценно компенсировать повреждение или утрату морфологической структуры организма. Особое значение имеет исследование биосовместимости компонентов, а для имплантатов на основе биоразлагаемых полимерных композитов - времени, необходимого для полной деструкции внедряемого композита. За механизмы реагирования на чужеродный объект ответственны в первую очередь моноциты, дифференцирующиеся в макрофаги [1, 2,], которые концентрируются в очаге внедрения и начинают вырабатывать медиаторы воспаления, привлекающие другие макрофаги и способствующие процессу клеточной инфильтрации инородного тела. Биосовместимые материалы не должны вызывать резкого снижения метаболической активности макрофагов, однако в зависимости от биоразлагаемости имплантата клетки фагоцитируют материал либо инкапсулируют его, формируя гранулему [3]. В случае биоразлагаемого полимера полилактида, представленного в настоящей работе, имеет большое значение срок разложения материала в организме. **Цель исследования:** установить влияние макрофагов и состава композиционных материалов на основе полилактида (ПЛ, PL) и гидроксиапатита (ГА) на процесс деградации полимера в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. Для получения композитов использовали ПЛ в виде волокон и ГА в виде мелкодисперсного порошка в соотношении 90% мас. ПЛ (K1) и 70% мас. ПЛ (K3). ГА ресуспендировали в растворе ПЛ в хлороформе (10 мл хлороформа на 1 г полимера) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при 40° С, раствор выдерживали в ультразвуковой ванне в течение 20 минут, затем высаживали в пятикратном по отношению к хлороформу избытке изопропилового спирта на магнитной мешалке при 0° С. Полученные композиты высушивали, измельчали и формовали в таблетки массой 0,3 г, диаметром 2 см и толщиной 1 мм при помощи гидравлического пресса.



Первичные моноцитарные макрофаги выделяли из тромболойкоцитарной массы двух индивидуальных доноров по методике, описанной Грачевым А.Н. и др. [4]. В 12-ти луночный планшет помещали простерилизованные в этаноле образцы полилактида и композиционных материалов. Для оценки жизнеспособности макрофагов использовали клетки, культивированные на пластике. В лунки вносили по 2 мл клеточной фракции с концентрацией 1×10^6 клеток/мл, ресуспендированной в бессывороточной среде X-VIVO, в часть лунок добавляли стимулирующие агенты (IFN γ , IL4).

Планшеты выдерживались в CO₂-инкубаторе при 37°С в течение 42-х дней. Среда удалялась, образцы хранились при температуре 4° С. Из композитов ПЛ экстрагировали хлороформом в аппарате Сокслета. Определение молекулярных масс (ММ) полимера проводили методом ГПХ на жидкостном хроматографе Agilent 1200 с рефрактометрическим детектором (Agilent -Technologies, США) с применением программного обеспечения «AgilentGPC-AddonRev».

Результаты. На гистограммах 1 и 2 отображены ММ исходного ПЛ (100000) и ПЛ, извлеченного из образцов, выдержанных в клеточной культуре, при различных составах образцов и видах стимуляции. Из гистограммы 1 можно заключить, что интенсивность фагоцитоза при различных видах стимуляции неодинакова для различных доноров. В 50% случаев наибольшее снижение ММ наблюдается при провоспалительной стимуляции IFN γ , в 50% случаев оно больше, чем в случае нестимулированных (NS) клеток, в 66,7% случаев больше, чем в случае стимуляции противовоспалительным IL4. В 66,7% случаев ММ ПЛ в NS системах превышает ММ в системах, стимулированных IL4. Из гистограммы 2 видно, что скорость фагоцитоза выше в чистом ПЛ, чем в композитах, во всех случаях ММ образца ПЛ существенно меньше соответствующих значений для K1 и K3. В 66,7% случаев медленнее всего уменьшается ММ ПЛ в композите K3. Таким образом, при одновременном исследовании одного донора и типа образца (ПЛ, K1, K3) определенной закономерности нами выявлено не было, что свидетельствует о необходимости проведения персонифицированных исследований для каждого донора.

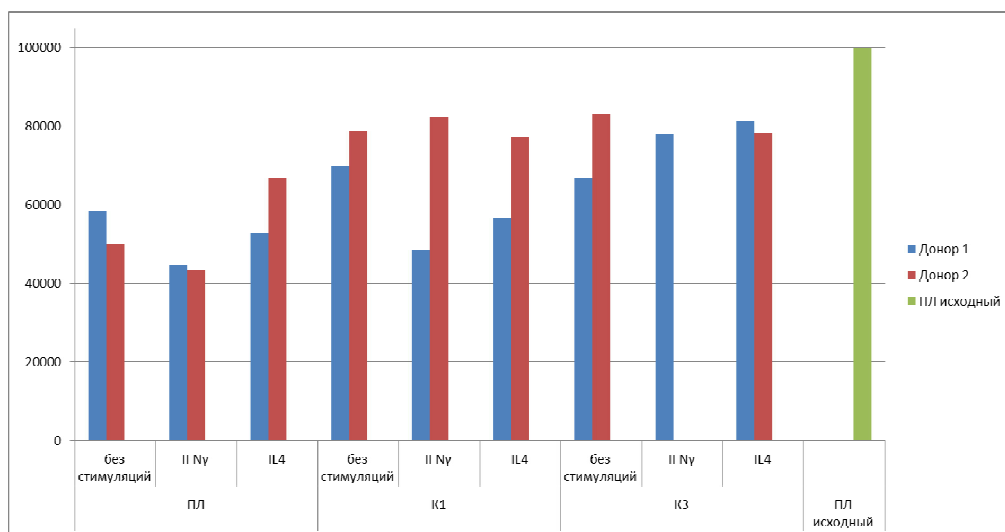


Рис. 2. Изменение ММ ПЛ в зависимости от типа материала

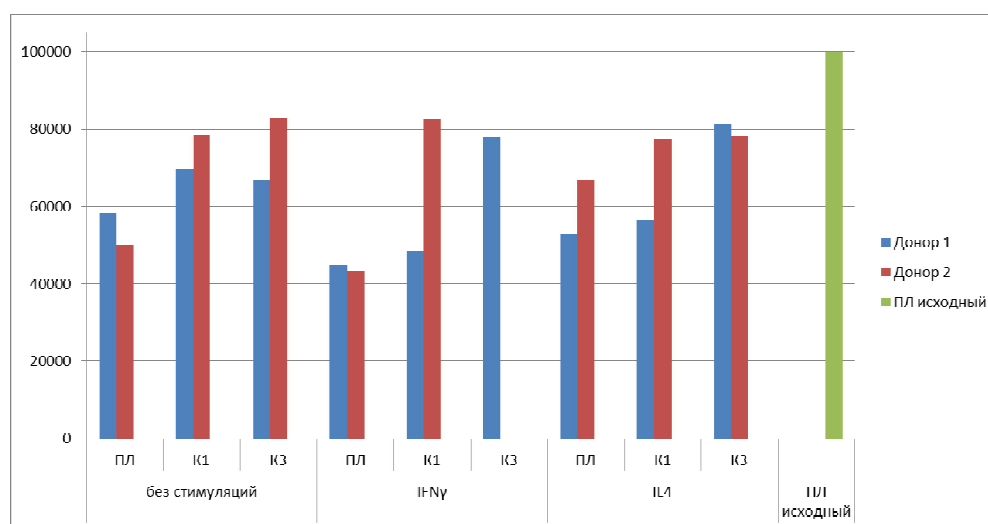


Рис. 3. Изменение ММ ПЛ в зависимости от стимулятора

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оноприенко Л.В. Молекулярные механизмы регуляции активности макрофагов // Биоорганическая химия. – 2011. – Т. 37. – № 4. – с. 437–451.
2. Монастырская Е.А. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии // Патогенез. – 2008. – Т. 6. – № 4. – с. 31–39.
3. Сарбаева Н.Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами // Гены & клетки. – 2016. – Т. 11. – № 1. – с. 9–17.
4. Грачев А.Н. Выделение моноцитов из крови человека для изучения влияния факторов внешней среды на иммунитет // Бюллетень Московского общества испытателей природы. – 2009. – Т. 114. – № 3. – с. 291–296.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ПРОГРЕССИИ И ИНГИБИРОВАНИЯ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ
ИЗМЕНЕНИЙ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ**

А.А. Щеголева, А.В. Исаева, Л.С. Ляпунова

Научный руководитель: к.б.н. Е.В. Денисов

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634050

E-mail: shegolmay@gmail.com

**MOLECULAR MARKERS OF PROGRESSION AND INHIBITION OF PREMALIGNANT CHANGES
IN THE BRONCHIAL EPITHELIUM**

A.A. Shchegoleva, A.V. Isaeva, L.S. Lyapunova

Scientific Supervisor: E.V. Denisov, PhD

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina Str. 36, 634050

Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, Russia, Tomsk, Kooperativny Str. 5, 634050

E-mail: shegolmay@gmail.com

***Abstract.** In this study, we analyzed expression profiles of various changes in the bronchial epithelium (basal cell hyperplasia, squamous metaplasia and dysplasia) and found specific genes for each bronchial change depending on their combinations with each other. Expression of the proteins encoded by these genes was validated in lung tissue samples using the database The Human Protein Atlas. The described genes are possible markers of progression and inhibition of premalignant changes in the bronchial epithelium.*

Введение. Предопухолевый процесс при плоскоклеточном раке лёгких, одной из форм немелкоклеточного рак лёгких (НМРЛ), является сложным многоступенчатым процессом, характеризующимся последовательным накоплением генетических и молекулярных нарушений и идущим параллельно с морфологическими изменениями от нормального эпителия через базальноклеточную гиперплазию (БКГ) и плоскоклеточную метаплазию (ПМ) к дисплазии (Д, I-III степени) [1]. Ранее мы показали, что у больных НМРЛ в нормальной ткани легкого, отдаленной от опухолевого очага, наблюдаются различные сочетания морфологических изменений эпителия бронхов: изолированная БКГ (иБКГ), БКГ, сочетающаяся с ПМ (пмБКГ), ПМ, сочетающаяся с БКГ (бкгПМ) и ПМ, сочетающаяся с дисплазией (дПМ), дисплазия (Д). Наличие различных вариантов предопухолевых изменений было ассоциировано с прогрессией НМРЛ. Наличие изолированной БКГ в мелких бронхах больных с НМРЛ было связано с высокой частотой гематогенного метастазирования [2], а сочетание БКГ и ПМ – с повышенной вероятностью рецидивирования заболевания [3].

Последние наши данные указывают на то, что экспрессионный профиль БКГ и ПМ зависит от того, сочетаются они друг с другом или нет. Кроме того, мы подтвердили, что БКГ и ПМ отличаются от нормального эпителия, а также друг от друга в экспрессионном плане. Тем не менее, варианты БКГ более схожи друг с другом, чем с ПМ. Тогда как бкгПМ по экспрессионному профилю ближе к БКГ, чем к дПМ [4].

Вероятно, вышеперечисленные варианты морфологических изменений эпителия бронхов представляют различные предопухолевые состояния, одни из которых прогрессируют далее (например, дПМ в Д), а другие – останавливаются или вовсе реверсируют до нормального эпителия. В этом плане, актуальным является поиск возможных маркеров, на основании которых можно было бы судить о риске прогрессирования или ингибирования предопухолевого процесса в легком.

Таким образом, целью настоящего исследования был поиск генов, специфических для каждого из вариантов морфологических изменений эпителия бронхов, как потенциальных маркеров вероятности протекания различных сценариев предопухолевого процесса.

Материалы и методы исследования. В исследовании использовались данные полнотранскриптомного профилирования различных морфологических изменений эпителия бронхов: иБКГ, пмБКГ, бкгПМ, дПМ и Д (GEO, GSE GSE81819). Отбор дифференциально экспрессирующихся генов между разными предопухолевыми изменениями проводился в среде R с использованием пакета *limma*. В анализ брали специфические гены, гипо- или гиперэкспрессирующиеся в каком-либо морфологическом изменении ($p < 0.05$). Функциональное аннотирование специфических генов проводилось с помощью базы данных GeneCards. Экспрессия белков, кодируемых данными генами, в нормальном эпителии бронхов, различных предопухолевых изменениях и опухолевой ткани оценивалась с помощью ресурса The Human Protein Atlas и иммуногистохимического окрашивания соответствующих образцов.

Результаты. Для каждого из вариантов морфологических изменений эпителия бронхов были найдены специфические гены. Наибольшее их количество было в дисплазии, наименьшее, всего один неохарактеризованный транскрипт, – в пмБКГ.

Таблица 1.

Гены, гипо- или гиперэкспрессирующиеся в различных морфологических изменениях эпителия бронхов

	иБКГ	пмБКГ	бкгПМ	дПМ	Д
Гиперэкспрессия	<i>TMEM81</i> <i>VMO1</i>	<i>XLOC_012803</i> (некодирующая РНК)		<i>KHK</i> <i>PCDH18</i>	<i>MS4A3</i> <i>BTN1A1</i>
Гипоэкспрессия	<i>VASP</i>		<i>BHLHB9</i>	<i>MAP7D2</i> <i>CCDC114</i> <i>ITPR2</i>	<i>CTAG1A</i> <i>PCDH10</i> <i>LIFR</i> <i>HOXB6</i> <i>EVI2A</i> <i>TAC4</i> <i>XAGE2</i> <i>WBSR17</i>

Примечания: иБКГ, изолированная БКГ; пмБКГ, БКГ, сочетающаяся с ПМ; бкгПМ ПМ, сочетающаяся с БКГ; ПМ, дПМ, сочетающаяся с дисплазией; Д, дисплазия.

Для каждого из генов был оценен изначальный уровень флюоресценции на микроматрицах. Только гены (*BHLHB9*, *MAP7D2*, *PCDH18*, *CCDC114* и *BTN1A1*) с наибольшим изменением флюоресценции в каждом типе предопухолевых состояний были выбраны для дальнейшей оценки экспрессии кодируемых ими белков.

Ген *BHLHB9* (Basic Helix-Loop-Helix Family Member B9) кодирует фактор транскрипции и играет роль в контроле клеточного старения. По нашим данным гиперэкспрессия этого гена характерна для бкГПМ.

Ген *PCDH18* (Protocadherin 18) кодирует белок клеточной адгезии, который играет важную роль в контактах нейрональных клеток друг с другом. Несмотря на это, данный белок также экспрессируется в тканях легкого. Гиперэкспрессия гена *PCDH18* наблюдается в дПМ.

Ген *MAP7D2* (Microtubule Associated Protein 7 Domain Containing 2) экспрессируется в эпителиальных клетках, кодируемый им белок вовлечен в динамику микротрубочек. Экспрессия этого гена в значительной степени снижена в дПМ, чем в остальных изменениях.

Ген *CCDC114* (Coiled-Coil Domain Containing 114), белок которого является компонентом “the outer dynein arm docking complex (ODA-DC)”. Данный комплекс ответственен за прикрепление внешней динеиновой «ручки» к поверхности микротрубочек. Экспрессия гена *CCDC114*, как и кодируемого белка, снижена в дПМ.

Ген *BTN1A1* (Butyrophilin Subfamily 1 Member A1), член семейства иммуноглобулинов, ингибирует пролиферацию CD4 и CD8 Т-клеток, Т-клеточный метаболизм и секрецию IL2 и IFNG. Гиперэкспрессия этого гена характерна для дисплазии. Экспрессия белка BTN1A1 в нормальном эпителии бронхов значительно снижена.

Заключение. Для каждого варианта морфологических изменений эпителия бронхов найдены специфические гены, описана их функциональная значимость и валидирована экспрессия на белковом уровне в образцах ткани легкого. Описанные гены представляют диагностическую ценность как возможные маркеры для оценки риска прогрессирования или ингибирования предопухолевого процесса в бронхиальном эпителии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект №17-29-06002).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kadara H., Wistuba I.I. (2014) Molecular Biology of Lung Preneoplasia. Lung Cancer, Ch. 6, pp. 110-128.
2. Пат. 2489718 РФ. МПК G01N 33/48. Способ прогнозирования возникновения гематогенных метастазов при плоскоклеточном раке легкого / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер. Заявлено 22.06.2012; Опубл. 10.08.2013, Бюл. № 22.
3. Pankova O.V., Denisov E.V., Ponomaryova A.A., Gerashchenko T.S., Tuzikov S.A., Perelmuter V.M. (2016) Recurrence of squamous cell lung carcinoma is associated with the co-presence of reactive lesions in tumor-adjacent bronchial epithelium. Tumor Biology, Vol. 37, no. 3, pp. 3599–3607.
4. Щеголева А.А., Геращенко Т.С., Таширева Л.А. Экспрессионные характеристики различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия // Перспективы развития фундаментальных наук: Доклады XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Томск 2017. – Т. 4. – С.184–186.

**АБДОМИНАЛЬНАЯ ЖИРОВАЯ ТКАНЬ АУТБРЕДНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПРИ
АДАПТАЦИИ К РАЗНЫМ ТЕМПЕРАТУРНЫМ РЕЖИМАМ**

А.В. Якуненко

Научный руководитель: доцент, к.б.н. Е.И. Елсукова
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева»,
Россия, г. Красноярск, ул. Ады Лебедевой, 89, 660049
E-mail: dedesterlocke@gmail.com

**INTRA-ABDOMINAL ADIPOSE TISSUE OF LABORATORY MICE ADAPTED TO DIFFERENT
TEMPERATURE REGIMES**

A.V. Yakunenkov

Scientific Supervisor: assistant professor, Ph.D. of Biological Sciences. E.I. Elsukova
Krasnoyarsk State Pedagogical University named after V. P. Astafev,
Russia, Krasnoyarsk, Lebedeva st., 89, 660049
E-mail: dedesterlocke@gmail.com

***Abstract.** For the first time the presence of beige adipocytes, cellularity, basic metabolic parameters of perigonadal abdominal fat have studied in autbred laboratory mice kept at different temperature regimes: 1) 30 °C (thermoneutral zone) and 2) regular daily 8-hour cold exposures. Unlike brown fat in the abdominal depot, temperature-dependent changes of these parameters were not detected. The functions of the beige adipocytes of the abdominal depot were discussed.*

Введение. Абдоминальная жировая ткань – важнейший эффектор энергообмена, углеводного и липидного обменов, многофункциональный эндокринный орган [1]. Возрастные или приобретенные нарушения ее функционирования являются ключевыми в патогенезе ожирения и метаболического синдрома. Их развитие замедляется, если в абдоминальном жировом депо присутствует небольшая популяция адипоцитов с разобщающим белком UCP1, идентичным специфическому термогенному маркеру бурого жира [2, 3]. Происхождение и функции этих клеток, названных бежевыми адипоцитами, не изучены. Предполагают, что холодовые воздействия могут стимулировать увеличение численности бежевых адипоцитов и термогенез в них [2]. Однако эти предположения недостаточно подкреплены экспериментальными данными. Целью данной работы было изучение динамики морфофункциональных и метаболических показателей абдоминальной жировой ткани, состояния UCP1-позитивных клеток в ней при адаптации аутбредных лабораторных мышей к разным температурным режимам.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проведены на самцах аутбредных мышей ICR (питомник ГНЦ ВБ «Вектор») с соблюдением правил Хельсинкской декларации о гуманном отношении к лабораторным животным. В 1 эксперименте опытная группа содержалась в течение 3 недель при 30°C (термонейтральная зона), во 2 эксперименте животные адаптировались в течение 2 мес к регулярным 8-ч экспозициям при 10°C. Контрольные группы содержались при 23°C. Окологонадное скопление абдоминального депо и межлопаточный бурый жир экстирпировали после декапитации животных. Интенсивность энергообмена тканей оценивали по скорости поглощения O₂ *in vitro* при 37°C

[4]. Тканевые гомогенаты готовили в буфере 0,01 М трис-HCl с 1 мМ ЭДТА, pH 7,2. Содержание ДНК определяли по результатам спектрофотометрии тканевого гидролизата при 270 и 290 нм [5]. Общий белок определяли по методу Лоури. Белок UCP1 идентифицировали в гомогенатах с помощью Вестерн-блоттинга [4]. На дорожку полиакриламидного геля наносили 60 мкг белка. Электроперенос белка на нитроцеллюлозу (0,2 мкм) проводили полусухим способом, нагрузочный контроль не использовался. Полосу UCP1 выявляли с помощью препаратов антител Sigma Aldrich (USA), ее интенсивность на блоте оценивали с помощью программы «GelAnalyzer». Статистический анализ различий между группами выполнен с помощью критерия Манна-Уитни.

Результаты. Тестируемые температурные режимы стимулировали значительные и разнонаправленные биохимические и функциональные изменения в межлопаточном буром жире (табл. 1). При адаптации животных к термонеutralным условиям содержание ДНК, тканевого белка снижались в нем в 2 раза. При адаптации к холодным воздействиям содержание ДНК увеличивалось более чем в 2 раза, скорость потребления O_2 *in vitro* увеличивалась на 57%. Таким образом, динамика показателей энергетического и пластического обменов в буром жире согласуется с его функцией как основного эффектора факультативного холод-индуцированного термогенеза.

По сравнению с бурым жиром в окологонадном жире изменения при обоих видах температурных адаптаций были однонаправлены – снижение скорости потребления O_2 и содержания белка (табл. 1).

Таблица 1

Свойства жировых тканей мышей при адаптации к различным температурным режимам

Показатели жировых тканей	Окологонадный жир		Межлопаточный жир	
	Контроль, n=10	Опыт, n=6	Контроль, n=11	Опыт, n=6
30 °C в течение 3 недель				
Масса, мг	372,73±42,02	562,13±58,98*	90,80±3,79	114,50±10,15
Масса, %	1,03±0,11	1,50±0,15	0,25±0,01	0,30±0,02
ДНК, мкг/мг	0,19±0,04	0,13±0,03	0,58±0,07	0,22±0,02*
Белок, мкг/мг	32,64±5,91	16,08±1,64*	100,13±8,19	45,53±6,16*
VO_2 , нмоль/мин•мг	0,17±0,04	0,10±0,01	1,38±0,17	1,22±0,24
	Контроль, n=6	Опыт, n=10	Контроль, n=6	Опыт, n=10
10 °C (9 -17 ч), в остальное время 23 °C				
Масса, мг	502,80±40,84	567,10±66,28	138,80±15,46	105±10,62
Масса, %	1,25±0,18	1,38±0,14	0,33±0,04	0,25±0,02
ДНК, мкг/мг	0,18±0,029	0,17±0,025	1,26±0,05	2,86±0,24*
Белок, мкг/мг	47,64±9,24	29,06±9,51	122,08±8,03	148,80±18,21
VO_2 , нмоль/мин•мг	0,27±0,04	0,14±0,017	1,14±0,08	1,80±0,12*

*Примечание: * $p < 0,05$ – статистическая значимость различий между контрольной и опытной группами*

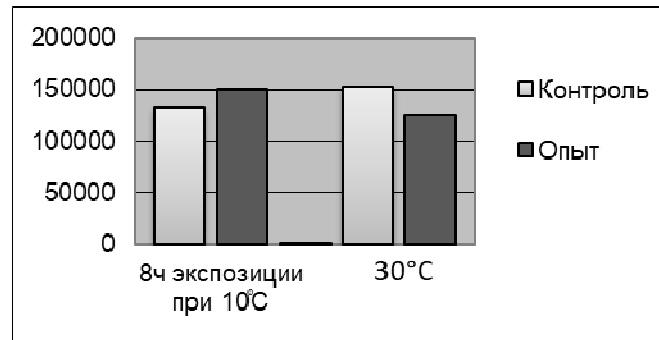


Рис. 1. Интенсивность полосы белка UCP1 (у.е.) в окологонадной жировой ткани животных, содержащихся при разных температурных режимах

При адаптации к 30°C эти изменения сочетались с 1,5-кратным увеличением массы жирового депо, так что в пересчете на весь окологонадный жир эти показатели в «теплой» группе не отличались от контроля. В «холодной» группе масса окологонадного жира не отличалась от контроля, тенденция к снижению энергообмена и общего белка сохранялась при обоих способах расчета показателей. Можно предположить, что такая динамика показателей обусловлена усилением липогенеза, что при свободном доступе к корму представляется целесообразной реакцией на холодовые воздействия. Маркер бежевых адипоцитов белок UCP1 определялся в пробах окологонадного жира во всех группах. В каждой группе животных исследовано по 3 пробы. Интенсивность полосы UCP1 в пересчете на все окологонадное скопление в группе мышей, адаптированных к холоду, была выше, а в группе животных, содержащихся при 30°C, ниже, чем в контроле (рис. 1). Однако эти различия не были статистически значимыми.

Заключение. Полученные результаты не согласуются с предположениями о терморегуляторной функции бежевых адипоцитов абдоминальной жировой ткани, либо используемые в работе холодовые нагрузки недостаточны для заметной индукции термогенеза в этом резервном пуле UCP1-позитивных клеток. Учитывая локализацию этой популяции бежевых адипоцитов в ядре тела, накапливающиеся данные об их стимуляции в условиях пищевой рестрикции [4], представляется, что слабый локальный термогенез в них через подогрев чувствительных нервных окончаний может представлять обратную связь для совместной настройки гипоталамических центров терморегуляции и пищевого поведения.

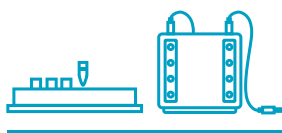
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosen E., Spiegelman B. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell*, vol. 156, pp. 20-44.
2. Ramseyer V., Granneman J. (2016). Adrenergic regulation of cellular plasticity in brown, beige/brite and white adipose tissues. *Adipocyte*, vol. 5, pp. 119–129.
3. Yamada T., Katagiri H., Ishigaki H., Oqihara T. et al (2006). Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: Neuronal involvement in food-intake regulation. *Cell Metab.*, vol. 3, pp. 223-229.
4. Mizonova O.V., Elsukova O.V., Medvedev L.N. (2013). Energy metabolism and biochemical features of adipose tissues in ICR mice after long-term calorie-restricted diet. *Bull. Exp. Bio. Med.*, vol. 155, pp. 745-747.
5. Трудолюбова М.Г. Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных // *Современные методы в биохимии* – М.: Медицина, 1977. – С. 313–316.



Компания Хеликон обеспечивает полный рабочий процесс необходимым оборудованием и расходными материалами для молекулярной и клеточной биологии и прикладных исследований.

ДЕЛАЕМ ВОЗМОЖНОЙ РАБОТУ ЛАБОРАТОРИЙ В РОССИИ НА МИРОВОМ УРОВНЕ



ООО «Компания Хеликон» поставляет передовые решения ведущих мировых брендов и производит лабораторное оборудование для молекулярной биологии.

Подробнее на сайте www.helicon.ru



ДОСТАВКА



ОБУЧЕНИЕ



**СЕРВИСНОЕ
ОБСЛУЖИВАНИЕ**



**МЕТОДИЧЕСКАЯ
ПОДДЕРЖКА**

Центральный офис:

119991 г. Москва, Ленинские Горы, МГУ, д. 1, стр. 40
Тел. 8 [800] 770-71-21 Факс +7 [495] 930-00-84
mail@helicon.ru

www.helicon.ru

Представительство в Сибирском регионе:
630090 г. Новосибирск, ул. Инженерная, 28
Тел. +7 [383] 207-84-85, novosibirsk@helicon.ru

Представительство в Северо-Западном Регионе:
195220 г. Санкт-Петербург, ул. Гжатская д. 22 корп. 1
Тел. +7 [812] 244-85-52, spb@helicon.ru

Представительство в Приволжском регионе:
420021 г. Казань, ул. Татарстан, д. 14/59, оф. 201
Тел. +7 [843] 202-33-37, volga@helicon.ru

Представительство в Южном регионе:
344116 г. Ростов-на-Дону, ул. 2-ая Володарская, д. 76/23а
Тел. +7 [863] 294-87-66, rostov@helicon.ru



Компания СкайДжин предлагает к поставке со склада в Москве и под заказ наборы реагентов, оборудование, расходные материалы, реактивы, а также специализируется на сервисном обслуживании и поверке дозаторов, лабораторных весов различных производителей. Мы предлагаем гибкие условия работы и очень большой ассортимент продукции.

Поставляемая нашей компанией продукция широко используется в научно-исследовательских лабораториях и R&D центрах, лабораториях секвенирования, при решении практически любых молекулярно-биологических задач.

Большая часть производителей в нашем портфолио - это прямые, эксклюзивные поставки. Мы являемся первым звеном в поставках для таких компаний как New England Biolabs, Agilent Technologies, Oxford Nanopore Technologies, QIAGEN, 10x Genomics, NIMAGEN, Integrated DNA Technologies, Thermo Fisher Scientific, SIGMA-ALDRICH, BioSan, Gilson.

К флагманским продуктам наших линеек относятся:

- Набор для пробоподготовки образцов от New England Biolabs ULTRA II FS с интегрированной системой фрагментации и другие наборы серии ULTRA для образцов ДНК, РНК и микроРНК;
- Digital NGS: готовые панели и наборы для обогащения на основе ПЦП от QIAGEN с мономолекулярным баркодированием;
- Специализированные наборы для работы с микроРНК и анализа экспрессии от QIAGEN-Exiqon;
- Уникальная система Chromium производства 10x Genomics для автоматической пробоподготовки геномов и транскриптомов единичных клеток.

За дополнительной информацией о производителях, товарах, ценах и условиях поставки обращайтесь к нашим квалифицированным специалистам:

Тел: 8 (495) 215 02 22

info@skygen.com

Бесплатная линия: 8 (800) 333 12 26

www.skygen.com

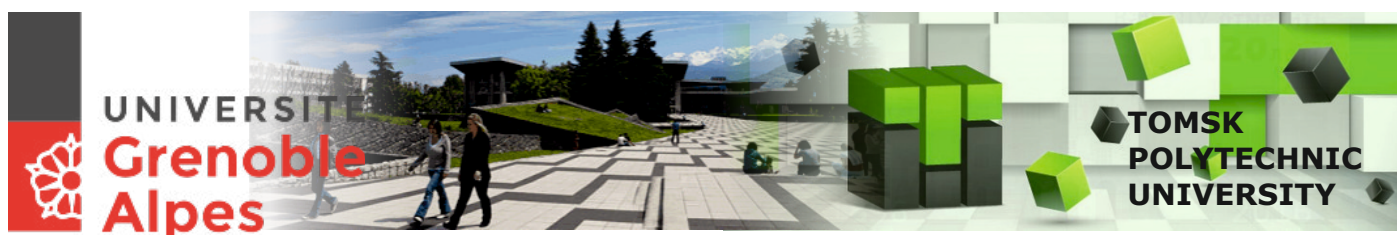
Будем рады ответить на Ваши вопросы и помочь выбрать качественное и недорогое решение для Ваших задач!





**Магистерская программа по направлению 22.04.01
Материаловедение и технология материалов**

Производство изделий из наноструктурных материалов



- **Магистерская программа двойного диплома Double-Degree:** магистрант может получить два диплома: диплом ТПУ и диплом Université Grenoble Alpes
- **Индивидуальный подход в обучении:** мы предлагаем вам обучаться по индивидуальному учебному плану и освоить ряд дисциплин дистанционно.
- **Лучшие условия для научной работы:** 40 единиц высокотехнологичного и аналитического оборудования, исследования с зарубежными партнерами
- **Практика в ведущих университетах мира:** Université Grenoble Alpes, France; Université de Montreal, Canada; Feng Chia University, Republic of China; Université de Lorraine, France; НИТУ «МИСиС», Москва
- **Места работы наших выпускников:** MERZ Freedom Technologies, Germany; Казахский национальный университет, Казахстан; Карагандинский государственный университет, Казахстан; Гжельский завод «Электроизолятор», Москва; ООО «Уралспецтранс», Екатеринбург; ЗАО «НЭВЗ-КЕРАМИКС», Новосибирск; ОАО «ТомскНИПИнефть», Томск; НПФ «МИКРАН», Томск; ООО «Томскнефтехим», Томск; НПЦ ОАО «Полюс», Томск; ОАО «Манотомь», Томск; АО «Сибхимкомбинат», Северск и др.

Приглашаем на экскурсию и беседу

Хасанов Олег Леонидович, директор Нано-Центра ТПУ, +7 (3822) 42-72-42, khasanov@tpu.ru
Годымчук Анна Юрьевна, доцент ТПУ, +7-906-947-50-27, vk.com/annagodymchuk, godymchuk@tpu.ru
 г.Томск, 634050, проспект Ленина, 2, корпус 15 ТПУ

 <https://vk.com/nanotpu>  <http://web.tpu.ru/webcenter/portal/nano/>  <https://www.facebook.com/nanotpu>



Научное издание

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

Сборник научных трудов
XV Международной конференции студентов, аспирантов
и молодых ученых

Компьютерная верстка *С.А. Поробова*

Подписано к печати 29.06.2018 г. Формат 60×84¹/₈.

Бумага для офисной техники. Гарнитура Times.

Усл. печ. л. 22,3.

Тираж 500 экз. Заказ № 3320.

Отпечатано на оборудовании
Издательского Дома

Томского государственного университета

634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

Тел.: 8+(382-2)–52-98-49

Сайт: <http://publish.tsu.ru>

E-mail: rio.tsu@mail.ru

ISBN 978-5-94621-727-9



9 785946 217279