

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

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

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

РОССИЯ, ТОМСК, 25 – 28 апреля 2017 г.

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

XIV International Conference of students, graduate students
and young scientists

Volume 4. Biology and Fundamental Medicine

RUSSIA, TOMSK, April 25 – 28, 2017



ИХТЦ
ИССЛЕДОВАНИЯ И РАЗРАБОТКИ



**БАНК
ХОУМ КРЕДИТ**
Просто. Быстро. Удобно.



открытие
БАНК



СБЕРБАНК
Всегда рядом



МИКРАН



Премьер
БКС
Больше, чем банк



MARS

Издательство Томский политехнический университет

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

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

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

РОССИЯ, ТОМСК, 25 – 28 апреля 2017 г.

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

XIV International Conference of students, graduate students
and young scientists

Volume 4. Biology and Fundamental Medicine

RUSSIA, TOMSK, April 25 – 28, 2017

ТОМСК 2017

ПРОГРАММА ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ

Химический факультет и Институт дистанционного образования Томского государственного университета приглашает дипломированных специалистов пройти программу повышения квалификации

«СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В ПОЛУЧЕНИИ И ИССЛЕДОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ»

Направление 04.03.01 Химия

Модульная структура обучения:

Модуль 1: Новые подходы и технологии в получении функциональных материалов

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

Профессиональные компетенции, формируемые в результате обучения:

- теоретическими знаниями в области современных методов получения функциональных материалов и изучения их физико-химических характеристик;
- умением выбирать необходимые методы и подходы к разработке функциональных материалов исходя из постановки задач и формы представления данных;
- основами технологии получения каталитических, фармацевтических, сорбционных, металлических и других функциональных материалов;
- умением выбирать необходимые методы анализа, исходя из постановки задач и формы представления данных;
- навыками работы на современном лабораторном оборудовании по аналитическому контролю материалов;
- навыками интерпретации полученных экспериментальных данных полученных на современном оборудовании при использовании физических и физико-химических методов исследования материалов.

Обучение в рамках образовательной программы реализуют ученые с высокой научной квалификацией из ведущих научных организаций РФ. Практическая часть курса проводится с использованием современного аналитического и исследовательского оборудования Лаборатории каталитических исследований и Лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ТГУ, Научно-образовательного центра «Наноматериалы и нанотехнологии» ТПУ.

КОНТАКТЫ

Руководитель программы: Слизов Юрий Геннадьевич, к.х.н., доцент, декан химического факультета ТГУ, dekanat@chem.tsu.ru.

Координатор программы: Зыкова Анна Петровна, к.ф.-м.н., доцент ТПУ, zykovaap@mail.ru.

АДРЕС

г. Томск, ул. А. Иванова, 49, корпус № 6, Химический факультет ТГУ

УДК 501(063)
ББК 20л0
П278

П278 Перспективы развития фундаментальных наук [Электронный ресурс]: сборник трудов XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Россия, Томск, 25–28 апреля 2017 г. / под ред. И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск: Изд-во – Национальный Исследовательский Томский политехнический университет, 2017. – Режим доступа: http://science-persp.tpu.ru/Arch/Proceedings_2017_vol_4.pdf – 186 с.

ISBN 978-5-4387-0748-6
ISBN 978-5-4387-0752-3

Сборник содержит труды участников XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспективы развития фундаментальных наук». Включает доклады студентов, аспирантов и молодых ученых, представленные на секции «Биология и фундаментальная медицина». Сборник представляет интерес для студентов, аспирантов, молодых ученых и преподавателей.

**УДК 501(063)
ББК 20л0**

Редакционная коллегия

И.А. Курзина, доктор физико-математических наук, доцент;
Г.А. Воронова, кандидат химических наук, доцент;
С.А. Поробова

ISBN 978-5-4387-0748-6
ISBN 978-5-4387-0752-3

© ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет», 2017
© Томский политехнический университет,
электронный текст, 2017

СЕКЦИЯ БИОЛОГИЯ И ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

- анатомия и физиология (включая патологические состояния) патология
- иммунология
- неврология и психиатрия
- клеточная биология и гистология
- генетика
- биохимия и молекулярная биология
- микробиология и вирусология
- биофизика
- биотехнологии
- биоинженерия
- фармакология и фармакогнозия
- кибернетика и биоинформатика
- биоматериалы: исследования *in vitro* и *in vivo*

ОГЛАВЛЕНИЕ

СЕКЦИЯ «БИОЛОГИЯ И ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА»

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ НОВОГО ВОЗБУДИТЕЛЯ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ КЛЕЩАМИ Г.О. Александров, А.М. Кондранова, Е.Е. Буйко	10
ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ФАЗОВО-КОНТРАСТНОЙ РЕНТГЕНОГРАФИИ В ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЪЕКТА С НИЗКИМИ АБСОРБЦИОННЫМИ СВОЙСТВАМИ В.О. Бабичева, А.С. Гоголев	13
СУММА АЛКАЛОИДОВ ТРАВЫ <i>Goevelia alopecuroides</i> Vge., ПОЛУЧЕННАЯ МЕТОДОМ МИКРОВОЛНОВОЙ ЭКСТРАКЦИИ Р.М. Балташ, А.К. Кокораева	16
РИТМИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ЗРИТЕЛЬНОГО ВОСПРИЯТИЯ ЧЕЛОВЕКА-ОПЕРАТОРА Ю.А. Баранова, В.С. Кунегин	19
СОЗДАНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К CD20 Т.Н. Беловежец	22
ИНИЦИАЦИЯ ПРОРАСТАНИЯ СПОР <i>Bacillus subtilis</i> УЛЬТРАЗВУКОМ С.С. Бойко	25
УПРАВЛЯЕМАЯ НИТРИФИКАЦИЯ Е.Н. Бурнашова	28
ПОЛУЧЕНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО АНТИКОАГУЛЯНТА ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ Н.Н. Буслаева, Д.И. Бояринцев	31
ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИИ ГЕНОВ <i>IL10</i> (RS1800872) И <i>TNFα</i> (RS2239704) С РАЗВИТИЕМ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ Д.Е. Гомбоева, И.Ж. Жалсанова	34
КАРИОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА В ПЕРИОД ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ СОЛНЦА А.А. Гороховский, В.Н. Котова	37
"ЭКГ-ЭКСПРЕСС" - ПОРТАТИВНОЕ УСТРОЙСТВО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СЕРДЦА ЧЕЛОВЕКА Д.О. Дементьев, А.А. Бояхчан, А.А. Уваров	40
ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МОНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО И.В. Дерюшева, М.М. Цыганов, Е.О. Родионов	43
ЭКСПРЕССИЯ АНТИ-АПОПТОЗНОГО БЕЛКА Bcl-xL В ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА ПРИ ИХ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ У.С. Дрозд	46
РОЛЬ РЕЦЕПТОРА ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА БЕТА I ТИПА В ПРОГРЕССИИ ЛЮМИНАЛЬНОГО ПОДТИПА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Т.А. Дронова	49
ТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНА ОРНИТИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> А.А. Егорова	52
ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И.Б. Жамангарина, М.Р. Патышева, А.А. Андреева	55

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ И АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИ ПОРАЖЕННЫХ СОСУДАХ А.А. Зарубин, А.В. Марков	58
СТАТУС ВПЧ И ЕГО ГЕНОМНАЯ ИНТЕГРАЦИЯ ВЛИЯЕТ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РШМ М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов, И.В. Дерюшева	61
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ У РАБОЧИХ НЕФТЯНЫХ ПРОМЫСЛОВ СИБИРИ Е.Н. Ильинских, Е.В. Замятина	64
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У РАБОТНИКОВ ЯДЕРНОГО ПРОИЗВОДСТВА, ПОДВЕРГАВШИХСЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ Д.С. Исубакова, Е.В. Брониковская, Т.В. Усова	67
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗНЫХ ВИДОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ ПАТОСПЕРМИИ С.И. Камалова, В.А. Машанова	70
ПЛАНИРОВАНИЕ НЕЙТРОН-ЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ С КОМПЛЕКСАМИ ГАДОЛИНИЯ ПО ДАННЫМ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ С ПАРАМАГНИТНЫМ КОНТРАСТИРОВАНИЕМ Н.И. Карпович	73
ДИНАМИКА СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МИЕЛИНА ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС А.А.Кисель	76
THE EFFECT OF HIGH CONCENTRATION OF MOLIBDENIUM AND ZINC ON THE GROWTH OF THE STRAIN THERMODESULFOVIBRIO SP. V2 FROM THE DEEP TERRESTRIAL BIOSPHERE К.М. Klimova	79
ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ ПРИ ПОВТОРНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ СЕЗОННЫМИ ШТАММАМИ ВИРУСА ГРИППА ТИПА А И В А.Ю. Кондаурова	82
КАРИОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ У ЛЮДЕЙ, СТРАДАЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В ОБЛАСТИ ОТОРИНОЛАРИНГОЛОГИИ В.Н. Котова, А.А. Гороховский, М.С. Ханьжин	85
КАРИОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ У ЛЮДЕЙ, СТРАДАЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В ОБЛАСТИ ОТОРИНОЛАРИНГОЛОГИИ В.Н. Котова, А.А. Гороховский, М.С. Ханьжин	88
ПОВЫШЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА АСТРОЦИТОВ В МОДЕЛИ ТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС М.С. Кудабаева	91
РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТА ПОЛИ (АДФ-РИБОЗО) ПОЛИМЕРАЗЫ 1 Т.А. Кургина	94
БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ИМПУЛЬСНЫХ ЭЛЕКТРОННЫХ ПУЧКОВ В ВОДНЫХ СРЕДАХ А.А. Курилова, А.В. Полосков	97
АКТИВНОСТЬ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗ СУПЕРСЕМЕЙСТВА FPG/NEI В ИНТЕРМЕДИАТАХ ТРАНСКРИПЦИИ К.А. Макашева	100
РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА РЕПАРАЦИИ ДНК ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ1 И ЕГО ПРИРОДНОГО МУТАНТА SCAN1 В КАЧЕСТВЕ ПРОТОТИПОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ Е.М. Мамонтова	103

ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ В КОЖЕ Г.А. Мартынов	106
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕГИЛИРОВАННОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ПРИ НАРУШЕНИЯХ СПЕРМАТОГЕНЕЗА, ВЫЗВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЕМ ИСТОЧНИКОВ ЕГО ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПУЛА В.А. Машанова, С.И. Камалова	109
СВЯЗЬ ХИТИНАЗО-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И.В. Митрофанова, М.М. Цыганов, Н.С. Телегина	112
АЦЕТОНОБУТИЛОВОЕ СБРАЖИВАНИЕ ГИДРОЛИЗАТОВ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ БИОБУТАНОЛА Т.С. Морозова	115
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ К КОМПОНЕНТАМ АКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ В.В. Нелюбова, М.Д. Рыкунова, Э.К. Калатози	118
АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ <i>DRD2</i> И <i>DRD3</i> С РАЗВИТИЕМ НЕЙРОЛЕПТИЧЕСКОЙ ГИПЕРПРОЛАКТИНЕМии У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ Д.З. Османова, И.В. Пожидаев, А.С. Бойко	121
РЕАКЦИЯ СТЕВЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК НА ЭМФИЗЕМУ ЛЕГКИХ Э.С.Пан, В.А. Крупин	124
АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ TAMARIX RAMOSISSIMA LEDEB Т.В. Пилипенко, О.В. Астафьева	127
ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ЦИТОХРОМОВ P-450 И ГЕНА БЕЛКА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ С РАЗВИТИЕМ ЛЕКАРСТВЕННО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРПРОЛАКТИНЕМии ПРИ ШИЗОФРЕНИИ И.В. Пожидаев, Е.Н. Воронина	130
THE ROLE OF CHEMOKINES IN THE RECRUITMENT OF PROGENITOR CELLS INTO THE TUMOR NICHE IN PATIENTS WITH BREAST CANCER V.S. Poletika, L.A. Tashireva	133
ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ СИБИРСКИХ ВИДОВ <i>SAUSSUREA</i> Я.Е. Решетов, М.Н. Шурупова, У.С. Пиримкулова	136
КОНСТИТУЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ В СТРУКТУРЕ ЭПИФИЗОВ ПЛЕЧЕВЫХ И БЕДРЕННЫХ КОСТЕЙ МУЖЧИН Р.В. Рябоконт, Н.В. Кошелев, Т.Э. Махмудов	139
ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 ПРИ ФОРМИРОВАНИИ АДДИКТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ Д.Н. Савочкина, Е.Г. Полтавская	142
АНЕУПЛОИДИЯ В ЦИТОТРОФОБЛАСТЕ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА С РАЗЛИЧНЫМ ГЛОБАЛЬНЫМ УРОВНЕМ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОМА Р.Р. Савченко, С.А. Васильев	145
МОНИТОРИНГ СОСТОЯНИЯ ФУНКЦИИ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ У ДЕТЕЙ С ОБОСТРЕНИЕМ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ О.Е. Семерник, А.О. Андреева, И.В. Семерник	148
МЕТИЛИРОВАНИЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНА LINE-1 ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ В.В. Серебрякова	151
СОЗДАНИЕ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ОСНОВЕ 10-ГО ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА III ТИПА Я.Г. Сизенцова	154
ИЗУЧЕНИЕ АДАПТАЦИИ И ВИРУЛЕНТНОСТИ ВИРУСА ГРИППА A(H1N1)PDM09 Е.И. Соловьева	157

РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА <i>SOMT</i> В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА И ЛЕВОДОПА-ИНДУЦИРОВАННЫХ ДИСКИНЕЗИЙ В.В. Тигунцев, И.А. Жукова	160
КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ ГЕМАТУРИИ МЕТОДАМИ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ И АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В.П. Толстоухова, М.Н. Семенова	163
ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МИКРОРНК В ОТВЕТ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО Л.А. Умарова, А.А. Пономарева, А.Ю. Добродеев	166
ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 НА ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КУПРИЗОНОВОЙ МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА Д.А. Федоришин	169
ВАЛИДАЦИЯ СВЯЗИ ГЕННОГО ПОЛИМОРФИЗМА С ПОВЫШЕННОЙ ЧАСТОТОЙ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У РАБОТНИКОВ РАДИАЦИОННОГО ПРОИЗВОДСТВА М.В. Халюзова	172
ШИРОКОГЕНОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ЯВЛЕНИЯ ПОТЕРИ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ М.М. Цыганов, И.В. Дерюшева, М.К. Ибрагимова	175
РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ЗАРОДЫШЕВОЙ ФОРМЫ ВИЧ-СПЕЦИФИЧНОГО ШИРОКО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА 10E8 Д.С. Черникова	178
ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ МОНОЦИТОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ПРОГРАММИРОВАНИЯ <i>IN VITRO</i> А.С. Шляхтун, И.В. Митрофанова, Е.Г. Шаповалова	181
ЭКСПРЕССИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ А.А. Щеголева, Т.С. Геращенко, Л.А. Таширева	184

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ В
ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ НОВОГО ВОЗБУДИТЕЛЯ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ КЛЕЩАМИ**

Г.О. Александров, А.М. Кондранова, Е.Е. Буйко

Научный руководитель: профессор, д.м.н. М.Р. Карпова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России,

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

E-mail: zoom2097@gmail.com

**USING MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS FOR THE DETECTION OF TOMSK
REGION NEW PATHOGENS TRANSMITTED BY TICKS**

G. O. Alexandrov, A. M. Kondranova, E.E. Buyko.

Scientific Supervisor: Prof., Dr. M.R. Karpova

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

E-mail: zoom2097@gmail.com

Abstract. *Tomsk Region is one of the leading places in Russia for the dissemination of natural focal infections spread by ticks. In addition to known pathogens in recent years in the grip of steel spirochetes identify new species - Borrelia miyamotoi, which causes relapsing fever. For the first time that Borrelia has been isolated from the taiga tick in Japan (Fukunaga et al., 1995) and has since recorded over a wide geographical area of Eurasia and North America, including a number of regions of Russia. B. miyamotoi transmitted by the same tick species as Ixodes tick borreliosis pathogen B. burgdorferi.s.l. In the absence of a specific diagnosis borrelioses caused by this pathogen are under diagnosed Ixodes tick borreliosis and determine the polymorphism of clinical. Infection with B. miyamotoi ticks lower than B. burgdorferi.s.l., Symptomatic disease this kind are considered very rare. The frequency of relapsing fever caused by B. miyamotoi, may increase with the introduction of routine diagnosis of tick-borne infections PCR test systems for the detection of B. miyamotoi. Due to the fact that on the territory of the Tomsk region attempts to highlight B. miyamotoi was no detection of the pathogen in ticks and blood of patients it is important.*

Введение. Боррелии (лат. Borrelia) – представляют собой подвижные палочки, которые имеют от 3 до 10 завитков. Относятся к роду бактерий, семейству Spirochaetaceae, порядку спирохет. Представители рода являются возбудителями опасных заболеваний. Такие как боррелиоз, болезнь Лайма и другие. Род насчитывает около 36 различных видов. Только 12 видов боррелий представляют угрозу жизни человека.

Томская область занимает одно из ведущих мест в России по распространению природно-очаговых инфекций, распространяемых клещами. Помимо известных возбудителей в последние годы в клещах стали выявлять спирохеты нового вида – *Borrelia miyamotoi*, который вызывает возвратную лихорадку [6]. Впервые эта боррелия была выделена из таёжного клеща в Японии [7] и с тех пор регистрируется в широкой географической зоне Евразии и Северной Америки, в том числе и ряде областей России [4, 5]. *B. miyamotoi* передается теми же видами клещей, что и возбудитель иксодового клещевого боррелиоза *B. burgdorferi*. В связи с тем, что на территории Томской области попыток

выделения *B. miyamotoi* не было, детекция этого возбудителя в клещах и крови больных является актуальным.

Целью работы является детекция *B. miyamotoi* в клещах и крови пациентов на территории Томской области с использованием ПЦР.

Материалы и методы исследования. В работе использовали молекулярно-генетические методы. Исследование проводилось в эпидемический сезон клещевых инфекций 2016 г. Было обследовано 203 клеща (имаго) и 15 пациентов. Изучаемые клещи относились к двум видам – *I. persulcatus* и *I. Pavlovsky* [4], из них 43 особи были собраны «на флаг» в соответствии с методическими указаниями № 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней» Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на территории г. Томска и Томской области. Остальные 160 клещей были сняты с людей, обратившихся в консультативно-диагностическую поликлинику Филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Томске «НПО «Вирион». Клещи присасывались к людям в разных районах г. Томска и Томской области.

На первом этапе исследования проводилась эвисцерация органоккомплекса клещей с дальнейшей экстракцией нуклеиновых кислот с использованием набора реагентов С-8896 РеалБест экстракция 100. Предварительно клещей последовательно отмывали в 70% спирте и физиологическом растворе. Гомогенизацию клещей проводили вручную с использованием жидкого азота согласно инструкции к набору реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l.» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) [3]. Полученный гомогенат суспендировали в 250 мкл раствора для приготовления образцов.

В работе также использовали пробы крови от 15 пациентов, поступивших в инфекционное отделение клиник СибГМУ с лихорадочным состоянием, наличием в анамнезе присасывания клеща и подозрением на заболевание клещевыми инфекциями. Выделение нуклеиновых кислот проводили из лейкоцитарной фракции крови больных с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

С целью определения в исследуемых образцах наличия ДНК *B. miyamotoi* применяли ПЦР-тест систему производства АО «Вектор-Бест».

Для подтверждения наличия специфической ДНК *B. miyamotoi* в крови пациентов было проведено секвенирование по участкам трех генов: *glpQ*, *23SrRNA*, *recA B. miyamotoi*. Детекцию нарабатываемых ампликонов по участку гена *glpQ B. miyamotoi* в ПЦР осуществляли с помощью разгорания специфического зонда. Синтез ампликонов определенной длины подтверждали в электрофорезе. Ампликоны были секвенированы по обеим цепям ДНК на автоматическом секвенаторе «ABIPrism 3100 DNAAnalyser» («AppliedBiosystems», США) сотрудниками Межинститутского центра секвенирования ДНК СО РАН (г. Новосибирск). Для филогенетического анализа полученных нуклеотидных последовательностей применяли программу MEGA 4.0, а для их сравнения с данными GenBank – поисковую систему «BLAST».

Результаты. Из 160 клещей, снятых с людей, ДНК *B. miyamotoi* была обнаружена в 10 особях (6,25%). Из 43 клещей, собранных с растительности ДНК *B. miyamotoi* была обнаружена в 4 особях (9,3%). Все клещи, в которых была обнаружена *B. miyamotoi*, принадлежали к виду *Ix. persulcatus*.

Из 15 обследованных пациентов только у одной больной с лихорадкой, развившейся в результате присасывания клеща, с помощью ПЦР-РВ была обнаружена ДНК *B. miyamotoi*. Для подтверждения ее

наличия было проведено секвенирование ДНК, выделенной из крови пациентки. Полученные последовательности ДНК соответствовали последовательностям *B.miyamotoi*, которые депонированы в GenBank, KU845211.1. По участку последовательности гена glpQ было отмечено полное совпадение с последовательностью glpQ *B.miyamotoi*, выделенной из крови больного в Хабаровске. По гену 23SrRNA и по гену гесА соответствие с последовательностями *B.miyamotoi* составляло 99%.

Заключение. Проведенное нами исследование показало наличие *B.miyamotoi* в иксодовых клещах, отловленных с растительности и снятых с людей, на территории Томской области. Используя метод ПЦР-РВ, мы обнаружили генетический маркер патогенной для человека боррелии, относящейся к группе клещевых возвратных лихорадок. Таким образом, впервые была подтверждена циркуляция *B.miyamotoi* на территории Томской области. ДНК, выделенная нами из крови больной с лихорадкой, соответствует ДНК *B.miyamotoi*, что подтвердил анализ последовательностей по трем участкам генов. Это дает основание предполагать участие *B.miyamotoi* в этиологии клещевых инфекций у пациентов на территории Томской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Багаутдинова Л. И., Сарксян Д. С., Дударев М. В., Малинин О. В., Кустарников Г. К., Шахов В. И., Малинин И. Е. Клинический полиморфизм заболевания, вызываемого *Borrelia miyamotoi* // ПМ. 2013. №5 С.125-130.
2. Малинин И. Е., Багаутдинова Л. И., Дударев М. В., Сарксян Д. С. Некоторые кардиологические аспекты клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia myamotoi* и *Borrelia burgdorferi sensu lato* // ПМ. – 2012. – №60 – С.166-169.
3. Иксодовые клещевые боррелиозы: методические рекомендации / под ред. заслуженного деятеля науки РФ академика РАМН Ю.В. Лобзина и [и др.]. – СПб, 2010. – 64 с.
4. Fomenko, N. V. et al. Detection of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes persulcatus* ticks in Russia // Entomological Review. – 2010. – V. 90. – № 8. – P. 1088–1094.
5. P.J. Krause D. Fish, S. Narasimhan. *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans //Clinical Microbiology and Infection. –2015. – P 631–339.
6. Heylen, D. et al. Songbirds as general transmitters but selective amplifiers of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genotypes in *Ixodes ricinus* ticks // Environ Microbiol. – 2013. DOI:10.1111/1462–2920.12304.
7. Мухачева Т.А., Ковалев С.Ю. *Borrelia miyamotoi* в клещах на территории Среднего Урала и Западной Сибири // Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций: материалы международной конференции (Санкт–Петербург, 5–7 июня) – СПб: Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 156.

**ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ФАЗОВО-КОНТРАСТНОЙ РЕНТГЕНОГРАФИИ В
ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЪЕКТА С НИЗКИМИ АБСОРБЦИОННЫМИ
СВОЙСТВАМИ**

В.О. Бабичева, А.С. Гоголев

Научный руководитель: профессор, д.м.н. В.Д. Заводовская
Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050
E-mail: valentina_babich@mail.ru

**APPLICATION OF THE PHASE-CONTRAST RADIOGRAPHY IN THE RESEARCH OF
BIOLOGICAL SUBJECTS WITH LOW ABSORPTION PROPERTIES**

V.O. Babicheva, A.S. Gogolev

Scientific Supervisor: Prof., Dr. V.D. Zavadovskaya
Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050
E-mail: valentina_babich@mail.ru

Abstract. *Phase contrast radiography is one of the newest methods of obtaining high-contrast X-ray images. In this paper, we consider the possibility of using phase-contrast X-ray imaging to improve the quality of biological structures on the example of the cow's knee. To solve this problem in the laboratory "X-ray optics" the Department of Applied Physics at Tomsk Polytechnic University Physical-Technical Institute, was designed and built hardware system for testing of the X-ray interferometry method with the use of diffraction gratings. As a result, the test studies on the obtained images can clearly be seen the structure of spongy bone and cartilaginous epiphysis epiphyseal plate over it.*

Введение. В настоящее время синтезирование искусственных биологических тканей на основе технологий 3D-печати открывает большие перспективы в лечении травм и заболеваний, которые до сих пор приводили к увеличению процента инвалидизации пациентов. Однако развитие и внедрение новых технологий ставит и новые задачи, такие как получение максимально точных данных о структурном и плотностном составе протезируемых тканей и органов, их форме и строении. Одной из важнейших проблем медицинской визуализации является разделение границ близких по своей плотности биологических структур, например, хрящевой ткани и суставной жидкости, различных мягких тканей, сосудов и органов средостения, брюшной полости.

На данный момент в целях медицинской визуализации применяют рентгенографию, компьютерную и магнитно-резонансную томографию, а также ультразвуковые способы исследования. Эти методы позволяют с достаточно большой точностью визуализировать крупные разнородные биологические объекты, однако границы близких по плотности структур остаются достаточно условными, что осложняет получение визуальной модели искусственной структуры и её дальнейшее изготовление. Эта проблема - проблема чувствительности - требует для своего решения совершенствования существующих методов визуализации; и одним из наиболее перспективных направлений является фазово-контрастная рентгенография.

Фазово-контрастная рентгенография с применением дифракционных решеток является усовершенствованным методом рентгеновской визуализации, который за последние несколько лет получил широкое признание специалистов. Получаемое с помощью фазово-контрастной рентгенографии изображение представляет собой классическую рентгенограмму, улучшенную посредством двух дополнительных изображений исследуемого объекта: его фазового контраста и темноплевого изображения. Лабораторные исследования показали, что фазовое контрастирование может обеспечить значительное улучшение дифференцировки близких по своей плотности тканей на изображении. Соответственно, теоретически, фазовое контрастирование позволяет существенно сократить дозу рентгеновского облучения при одновременном достижении сравнимого или лучшего пространственного и контрастного разрешения изображения по сравнению с традиционным, полученным на основе поглощения рентгеновских лучей.

Материалы и методы исследования. Для разделения рентгеновского излучения на фазы существуют несколько методов: рентгеновская дифракция, рентгеновская интерферометрия, линейная голография, кодирование диафрагмы, интерферометрия с применением дифракционных решеток. Каждый из методов обладает своими достоинствами и недостатками в разрезе их практической реализации, степени чувствительности и области применения. В своём исследовании мы выбрали метод рентгеновской интерферометрии с применением дифракционных решеток, который с одной стороны не требует сложного оборудования и манипуляций, а с другой стороны достаточно универсален и чувствителен [1].

Применение метода возможно в лабораторных условиях при создании квазимонохроматического излучения рентгеновской трубки. В лаборатории «Рентгеновская оптика» кафедры прикладной физики Физико-технического института Томского политехнического университета был изготовлен аппаратно-программный комплекс для испытания и исследования на практике метода рентгеновской интерферометрии [2, 3].

Основным оборудованием комплекса являются:

- рентгеновский генератор DXM60N600;
- рентгеновская трубка БСВ29;
- пиксельный детектор ModuPIX на основе чипа Timerix.

Целью данной работы является тестирование и оценка качества получаемых рентгеновских изображений оригинального аппаратно-программного комплекса, собранного на базе лаборатории «Рентгеновская оптика» ПФ ФТИ ТПУ на примере биологических объектов с низкими абсорбционными свойствами.

Эксперимент. На данном этапе разработки комплекса было проведено исследование тестового биологического образца (суставная часть колена млекопитающего) методом традиционной абсорбционной томографии [4]. Для эксперимента был специально подготовлен образец хрящевой ткани, как известно, обладающей низкими абсорбционными свойствами. Это обусловлено строением данного вида ткани: в своем составе хрящи имеют клетки и межклеточное вещество. Одной из особенностей межклеточного вещества хрящевой ткани является его высокая обводненность: содержание воды в норме колеблется от 60 до 80 %. Площадь, занимаемая межклеточным веществом, значительно больше площади, занятой клетками, соответственно на рентгенологическом снимке данная структура будет

почти незаметна, так как отличие плотности хрящевой ткани от плотности воды незначительно и коэффициент абсорбции для этих двух сред будет схожим. Для получения максимального разрешения объекты располагались непосредственно перед детектором. Пример теневой проекции приведен на рисунке 1а. На рисунках 1б, 1в приведены результаты томографической реконструкции биологического образца и полученные аппаратным способом срезы [5].

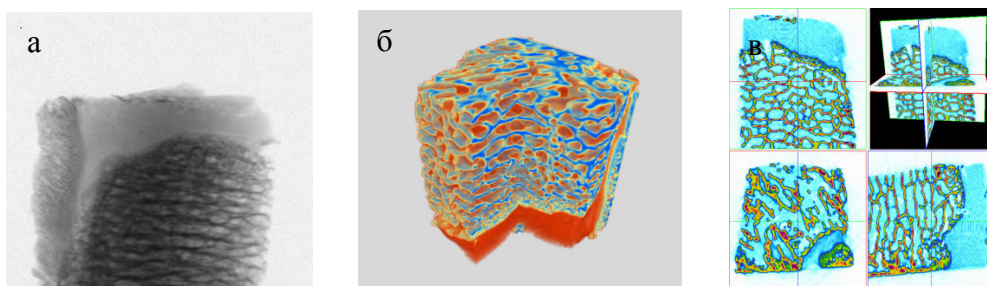


Рис. 1. Изображения, полученные при тестировании АПК:

а – теневая проекция хрящевой ткани, б – томографическая реконструкция, в – томографические срезы

Результаты. В результате проведенных тестовых рентгенологических исследований образца хрящевой ткани доказана корректность работы собранного АПК. На снимках четко прослеживается внутренняя структура объекта - губчатая структура эпифиза кости и хрящевая эпифизарная пластинка над ней. Следовательно, в результате проведенного эксперимента была доказана возможность работы АПК со сложными биологическими объектами.

Закключение. Таким образом, на данном этапе работы был собран и протестирован аппаратно-программный комплекс в условиях простого томографического сканирования биологического объекта, доказана корректность его работы в условиях сканирования низко абсорбционных тканей. В дальнейшем планируется провести комплекс экспериментов с различными образцами хрящевой ткани и сравнении полученных томографических срезов с гистологическими препаратами на базе лабораторий СиБГМУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muehleman C., Li J., Connor D., Parham C., Pisano E., Zhong Z. (2009). Diffraction-Enhanced Imaging of Musculoskeletal Tissues Using a Conventional X-Ray Tube. Academic Radiology, no 16, pp. 918-923.
2. Pogany A., Gao D., Wilkins S.W. (1998). Contrast and resolution in imaging with micro-focus x-ray source. Review of Scientific Instruments, no. 68, pp. 2774-2782.
3. Bonse U, Hart M. (1965). An X-Ray Interferometer. Applied Physics Letters, no. 6, p. 155.
4. Spellman DXM Series 1200W Industrial X-Ray Generators [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.spellmanhv.com/Products/DXM>. – 31.10.2016.
5. PRELUDE™ 420 LYSO [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.crystals.saint-gobain.com/products/prelude-420-LYSO>. – 31.10.2016.

**СУММА АЛКАЛОИДОВ ТРАВЫ *GOEBELIA ALOPECUROIDES* BGE., ПОЛУЧЕННАЯ
МЕТОДОМ МИКРОВОЛНОВОЙ ЭКСТРАКЦИИ**

Р.М. Балташ, А.К. Кокораева

Научный руководитель: PhD доктор, доцент Г.Ж. Байсалова

Евразийский Национальный университет им. Л.Н. Гумилева,

Казахстан, г. Астана, ул. Мунайтпасова, 5, 010000

E-mail: risabaltash@gmail.com

**TOTAL ALKALOIDS OF *GOEBELIA ALOPECUROIDES* BGE. GRASS OBTAINED BY
MICROWAVE EXTRACTION METHOD**

R.M. Baltash, A.K. Kokorayeva

Scientific Supervisor: PhD, associate professor G.Zh. Baisalova

L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazakhstan, Astana, Munaitpasov str., 5, 010000

E-mail: risabaltash@gmail.com

Abstract. Total composition of alkaloids obtained by microwave extraction was determined by chromatographic mass spectroscopic method. It was revealed that the major components are matrine (64.80%), sophoramin (20.71%). Embryotoxicity and antiviral activity of total alkaloids against avian influenza virus was also evaluated.

Введение. Растения рода *Goebelia* Bge. семейства *Fabaceae* широко распространены на территории Казахстана и издавна используются в качестве лекарственных растений в народной и традиционной медицине. Лекарственное действие растений этого рода обусловлено содержащимися в них биологически активными веществами – в основном алкалоидами и флавоноидами. Корневища с корнями *Goebelia alopecuroides* Bge. (*G. alopecuroides* Bge.) являются сырьем для получения препарата «Фланорин», который обладает гепатопротекторным действием [1]. В китайской традиционной медицине семена этого растения были использованы как противовоспалительное и антибактериальное средство [2].

Целью данной работы является получение, определение состава и оценка эмбриотоксичности и противовирусной активности суммы алкалоидов травы *G. alopecuroides* Bge..

Материалы и методы исследования. Растительное сырье, травы *G. alopecuroides* Bge. были собраны в мае 2016 года в Республике Казахстан, Кызыл-Ординская область, село Иркуль.

Навеску воздушно-сухой измельченной травы экстрагировали в микроволновом реакторе этиловым спиртом при 70°C, мощности 200 W в течение 20 минут.

После проведения микроволновой (МВ) экстракции спиртовой экстракт отфильтровывали на разборной тefлоновой воронке в вакууме водоструйного насоса, а растительное сырье вторично заливали 15 мл этилового спирта и МВ экстракцию повторяли еще раз. После двух экстракций этанольные экстракты объединяли. Растворитель удаляли на ротационном вакуумном испарителе, остаток высушивали в вакууме масляного насоса, взвешивали и определяли выход общего экстракта. Выход экстракта составил 15,86 ± 1,01%.

В колбу с высушенным этанольным экстрактом приливали по 20 мл хлороформа и 15 мл 2%-ного водного раствора соляной кислоты. Интенсивно перемешивали. От смолы отделяли в делительной воронке. Далее хлороформный слой экстрагировали трижды 15 мл водного раствора соляной кислоты. Полноту извлечения алкалоидов проверяли качественной реакцией на алкалоиды [3].

Полученный общий кислый экстракт доводили до pH 10, добавляя порциями сухой карбонат натрия. Щелочной раствор экстрагировали 20 мл хлороформа шесть раз. Полноту извлечения алкалоидов проверяли, как описано выше. Объединенные хлороформные вытяжки сушили над безводным сульфатом магния 12 часов. От сульфата магния отделялись фильтрованием через складчатый бумажный фильтр. Растворитель удаляли на ротационном испарителе, остаток сушили в вакууме масляного насоса, и взвешивали. Выход суммы алкалоидов составил 1.00%.

Для определения качественного и количественного состава суммы алкалоидов травы *G. alopecuroides* Bge. использован метод хромато-масс спектроскопии с идентификацией компонентов по базе данных.

Исследования по изучению эмбриотоксичности и противовирусной активности проводили в трехкратной повторности на 10-дневных куриных эмбрионах (КЭ), каждая экспериментальная группа состояла из пяти эмбрионов. Для экспериментов препарат (экстракт побегов софоры) разводили в фосфатно-солевом буферном (ФСБ) растворе (pH 7,2) с концентрацией 50 мг на 1 мл раствора и выдерживали около 30 мин при температуре 36,6°C до полного растворения.

Для изучения эмбриотоксичности препарат в дозе от 10 до 0,08 мг, растворенный в ФСБ растворе, в объеме 0,2 мл вводили в хорионаллантоисную полость эмбриона. Контролем служила группа, которой вводили ФСБ раствор без добавления препарата. Результаты учитывались по количеству погибших КЭ в течение всего периода до вылупления цыплят.

Для изучения вирусингибирующей активности использовали вирус гриппа птиц А/крячка/Южная Африка/1/61 (H5N3). К приготовленным разведениям препарата добавляли равный объем вируса (100 ЭИД_{50/0,2мл}). Полученную смесь выдерживали 60 мин при 36,6°C, затем вводили в хорионаллантоисную полость КЭ в объеме 0,2 мл. Контролем служили две группы эмбрионов: 1-ая – чистый раствор ФСБ, 2-ая – вирус в смеси с равным объемом ФСБ. Опытные и контрольные группы КЭ инкубировали при 36,6°C в течение 48 ч. Противовирусное действие определяли по наличию гемагглютинирующей активности вируса в аллантоисной жидкости.

Результаты. Как показывают хромато-масс спектроскопические данные, основными компонентами, обнаруженными в сумме алкалоидов травы *G. alopecuroides* Bge., являются матрин (1) и структурно родственные алкалоиды софорамин (2), софоридаин (3), цитизин (4) (на рисунке 1, 2-4), идентифицированы минорные алкалоиды 5,6-дидегидроспартеин-2-он и изософорамин (рисунок 1).

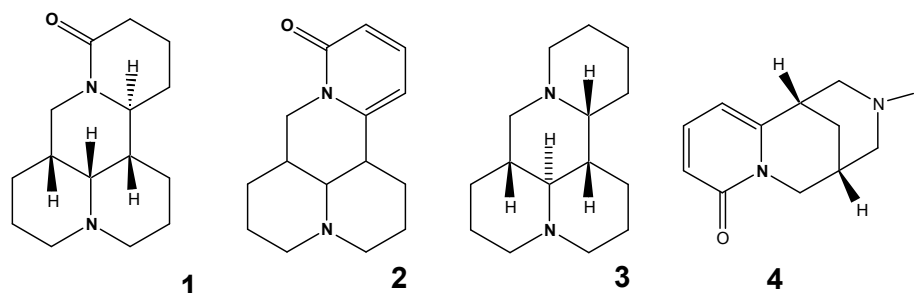


Рис. 1. Структурные формулы основных алкалоидов *G. alopecuroides* Bge.

Таблица 1

Компонентный состав сумм алкалоидов из травы *G. alopecuroides* Bge.

Rt	Компонент	ММ	%
20.142	не идентифицирован	232	3.49
22.079	цитизин	190	1.26
22.388	5, 6-дидегидроспартеин-2 -он	246	0.46
23.241	не идентифицирован	246	0.80
23.533	софорида	248	0.98
23.697	не идентифицирован	246	2.68
23.757	матрин	248	64.80
24.032	не идентифицирован	246	2.38
24.411	не идентифицирован	262	0.94
25.022	d-термопсин	244	0.34
25.117	изософорамин	244	0.61
25.358	софорамин	244	20.71

В ходе проведенных исследований у суммы алкалоидов выявлено токсическое действие в дозах 2,5 - 10 мг/КЭ, в дозе 1,25 – 0,08 мг/КЭ токсического влияния на развитие КЭ не выявлено. Также установлено, что препарат в дозах от 0,08 до 10 мг/КЭ не обладает способностью подавлять репродукцию вируса гриппа птиц А/Крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3).

Заключение. В результате проделанной работы получен и определен качественный и количественный состав суммы алкалоидов травы *G. alopecuroides* Bge.. Также оценена эмбриотоксичность и противовирусная активность суммы алкалоидов в отношении вируса гриппа птиц А/Крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Халилов Р.М., Котенко Л.Д., Нигматуллаев А.М., Маматханов А.У. Характеристика корней с корневищами *Pseudosophora alopecuroides*: Материалы IV Всероссийской конф. книга 2 – Барнаул, 2009. – С. 75-76.
2. Guan Y, Ma CH, Huang XY and et.al. Components of *Sophora alopecuroides* seeds // Chemistry natural compounds. – 2009. №45. – С. 545-546.
3. Химический анализ лекарственных растений: учебное пособие для фармацевтических вузов / Под ред. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич – М.: Высш. школа, 1983. – 176 с.

**РИТМИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ЗРИТЕЛЬНОГО ВОСПРИЯТИЯ
ЧЕЛОВЕКА-ОПЕРАТОРА**

Ю.А. Баранова, В.С. Кунегин

Научный руководитель: доцент, к.т.н. М.Н. Романовский

Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 40, 634050

E-mail: bara.1995@mail.ru

**RHYTHMIC STIMULATION OF VISUAL PERCEPTION IN
A HUMAN OPERATOR**

Y.A. Baranova, V.S. Kunegin

Scientific supervisor: M.N. Romanovskiy, PhD

Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics,

Russia, Tomsk, Lenin av., 40, 634050

E-mail: bara.1995@mail.ru

Abstract. *There's considered the effect of rhythmic visual stimulation (VS) on visual perception of a human operator. We used a proof E. Landolt test to estimate the parameters of visual perception. Conscious and unconscious VS at a frequency of 10 Hz increases the speed information processing, indicators of productivity and accuracy.*

Введение. Оператор системы «человек-машина» обычно рассматривается как канал связи между средствами отображения информации и органами управления. Переработка и передача информации представляется в виде «информационной воронки», – широкая часть воронки соответствует рецепторам оператора, средняя – корковому уровню, узкая – уровню ответных реакций [1]. В [2] сообщалось, что ритмическая визуальная стимуляция (ВС) человека-оператора с частотой 10 Гц – за счет мерцания символов на экране отображения информации – приводит к повышению его пропускной способности и надежности (уменьшению количества ошибок). Повышение пропускной способности связано с сокращением времени ответных реакций (поиска нужных символов на клавиатуре). Цель настоящей работы – экспериментальное исследование влияния ВС на скорость, продуктивность и точность зрительного восприятия человека-оператора.

Методика эксперимента. Излучатель установки для ВС представлял собой матрицу светодиодов, цвет излучения – зеленый. Для модуляции светового потока использовали ключ на биполярном транзисторе 2N5551 и генератор прямоугольных импульсов Tektronix AFG3021. Частота следования импульсов модуляции составляла 10 Гц; длительность – 10 мкс (неосознаваемая ВС) и 500 мкс (видимое мерцание). В работе участвовали 20 студентов с нормальным зрением в возрасте от 20 до 22 лет. Для оценивания параметров зрительного восприятия использовали корректурный тест Э. Ландольта [3]. Проведено шесть серий из десяти экспериментов с временным зазором в одну неделю. В каждом эксперименте испытуемые выполняли тест дважды – без модуляции светового потока и в процессе модуляции. При длительности импульсов модуляции $t_{\text{имп}} = 10$ мкс эксперименты проведены при двух последовательностях функциональных проб: 1) ВС – без ВС и 2) без ВС – ВС, при 500 мкс – по схеме 1).

Испытуемым не сообщалась последовательность функциональных проб, что при $t_{\text{имп}} = 10$ мкс исключало эффект плацебо.

Результаты и обсуждение. Средние и медианные (см. рис. 1) значения общего числа просмотренных колец Q в процессе ВС больше, чем без ВС. Уменьшение Q под воздействием ВС в отдельных экспериментах сопровождалось, как правило, ростом показателя точности работы A (рис. 2). При $t_{\text{имп}} = 10$ мкс прирост Q под воздействием ВС более значим ($p = 0,03$), чем при $t_{\text{имп}} = 500$ мкс. Спад показателя точности работы A в процессе ВС при $t_{\text{имп}} = 10$ мкс превалирует в экспериментах по схеме «без ВС – ВС», а в экспериментах по схеме «ВС – без ВС» A преимущественно не уменьшается, а растет, что может быть связано с последствием ВС в процессе эксперимента.

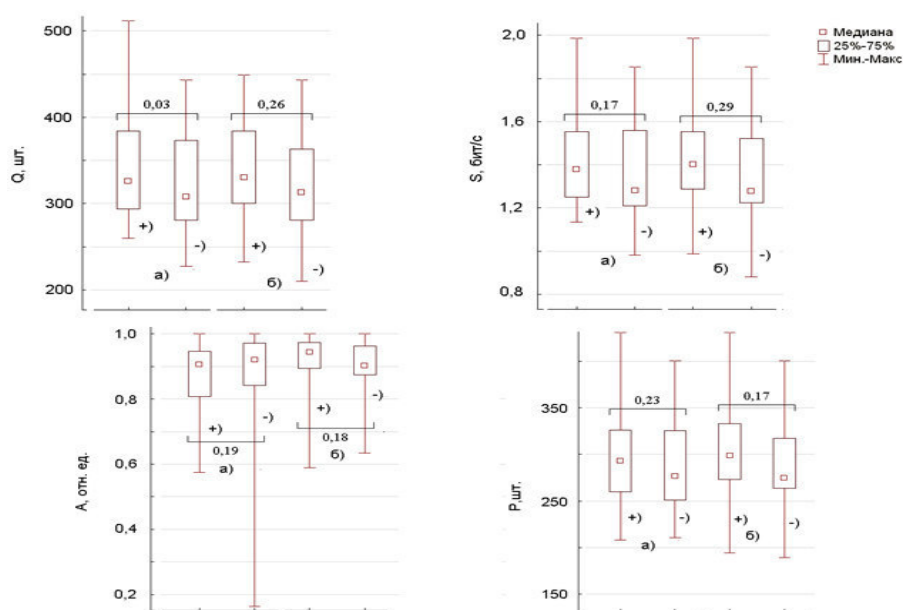


Рис. 1. Диаграммы размаха Q , S , A и P без (-) и в процессе (+) ВС при $t_{\text{имп}}$, мкс: а - 10, б - 500; над или под диаграммами – значения p -уровней по Вилкоксоу

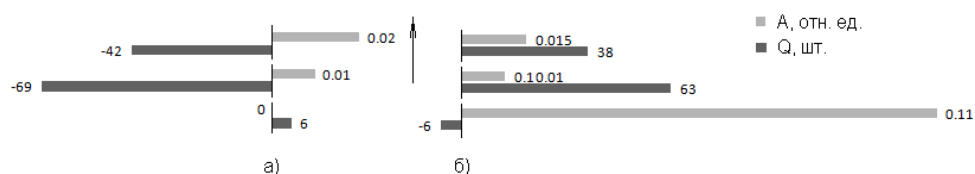


Рис. 2. Изменения A и Q под воздействием ВС для двух (а, б) испытуемых в трех последовательных экспериментах ($t_{\text{имп}} = 500$ мкс)

Точечная диаграмма общего числа просмотренных колец без (Q'') и в процессе (Q') ВС при $t_{\text{имп}} = 10$ мкс аппроксимируется выражением $Q'' = 95 + 0,65 Q'$ (рис. 3, а). Прирост Q под воздействием ВС $\Delta Q = Q' - Q''$ положителен при $Q'' > 270$ и для $Q'' = 450$ составляет 22 %. При $t_{\text{имп}} = 500$ мкс $Q'' = 130 + 0,58 Q'$ (рис. 3, б), $\Delta Q > 0$ при $Q'' > 300$. Точечные диаграммы S , A и P в координатах ВС – без ВС подобны диаграммам $Q''(Q')$ рис. 3; коэффициенты парной корреляции параметров составляют 0,4... 0,5 при $t_{\text{имп}} = 10$ мкс и 0,7... 0,8 при $t_{\text{имп}} = 500$ мкс.

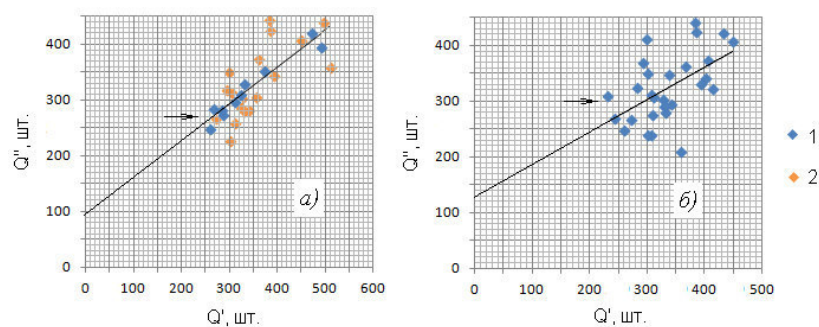


Рис. 3. Точечные диаграммы общего числа просмотренных колец без ВС (Q'') от общего числа просмотренных колец в процессе ВС (Q') в экспериментах по схеме «ВС – без ВС» (1) и «без ВС – ВС» (2) при $t_{имп}$, мкс: а – 10, б – 500

Механизмы переработки информации человеком соотносят с альфа-активностью головного мозга [4, 5]. ВС с частотой альфа-диапазона приводит к повышению альфа-активности [6]. Можно предположить, что повышение параметров зрительного восприятия под воздействием ВС происходит вследствие оптимизации функционального состояния человека-оператора.

Заключение. Как осознаваемая, так и на неосознаваемая ВС человека-оператора с частотой 10 Гц приводит к повышению скорости переработки информации, показателей продуктивности и точности работы. Влияние ВС на зрительное восприятие статистически менее значимо, чем на ответную реакцию человека-оператора [2].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Душков Б.А., Королев А.В., Смирнов Б.А. Энциклопедический словарь: Психология труда, управления, инженерная психология и эргономика / [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://vocabulary.ru/dictionary/896/word/propusknaja-sposobnost-operatora>. – 19.06.15.
2. Ахраров Н.М., Баранова Ю.А., Васильева М.В., Романовский М.Н. Ритмическая стимуляция пропускной способности человека-оператора // Фундаментальные проблемы радиоэлектронного приборостроения. – 2015. – Т. 15. – №5. – С. 60–63.
3. Сысоев В.П. Методика диагностики работоспособности. Тест Э. Ландольта. – СПб: «Иматон», 1996. – 30 с.
4. Базанова О.М. Современная интерпретация альфа-активности ЭЭГ// Международный неврологический журнал. – 2011. - № 8. – С. 96 – 104.
5. Basar E.(2012) A review of alpha activity in integrative brain function: Fundamental physiology, sensory coding, cognition and pathology. International Journal of Psychophysiology, no 86, pp. 1–24.
6. Бугров Е.В., Бразовский К.С., Романовский М.Н. К влиянию модулированных импульсов света на альфа-активность головного мозга // Электронные средства и системы управления: Материалы X Междунар. научно-практич. конф. – Томск, 2014. – Ч. 2. – С. 4–6.

**СОЗДАНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ,
СПЕЦИФИЧНЫХ К CD20**

Т.Н. Беловежец

Научный руководитель: к.б.н. А.А. Горчаков
Новосибирский государственный университет,
Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1, 630090
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,
Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8/2, 630090
E-mail: ochotanya@gmail.com

**DESIGN AND COMPARATIVE ANALYSIS OF CD20-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN
RECEPTORS**

T. N. Belovezhec

Scientific Supervisor: Ph.D. A.A. Gorchakov
Novosibirsk State University,
Russia, Novosibirsk, Pirogov str., 1, 630090
Institute of Molecular and Cell Biology SB RAS
E-mail: ochotanya@gmail.com

Abstract. *Despite many advances in target therapies, survival of patients with rALL remains dismal, particularly among adults. Nonetheless, adoptive transfer of T-cells expressing chimeric antigen receptors (CARs) specific for the surface B cell molecule CD19 has been shown to be highly successful, as 50-90% of rALL patients receiving this therapy have achieved spectacular and durable remissions. This has inspired several research groups to develop CARs recognizing alternative B-cell targets, such as CD20, CD22, and BCMA, so as to use them in patients with other B-cell malignancies or help the patients that are unlikely to respond to CD19CAR T-cell therapy. Currently, there are two CD20-specific CARs in clinical trials. These CARs are based on the sequences of murine monoclonal antibodies Leu16 and 1F5 and use distinct hinge, transmembrane and signaling modules. Although both of these CARs appear to work, their side-by-side comparisons or structural optimization have never been performed in vitro or in vivo. The goal of our project was to design a CD20-specific CAR based on the human monoclonal antibody 2F2 (ofatumumab) and to compare this CAR to Leu16- and 1F5-based CARs in a unified context.*

Введение. Во всем мире ситуация с тяжелыми онкогематологическими заболеваниями, такими как рецидивирующий или резистентный острый лимфобластный лейкоз и В-клеточные неходжинские лимфомы, по-прежнему остается достаточно серьезной. Эти заболевания поражают пациентов всех возрастов, и если у детей вероятность благоприятного исхода достаточно высока даже после одного рецидива, то у взрослых шансов на выздоровление гораздо меньше. В последние годы с развитием адоптивной Т-клеточной терапии в области гематоонкологии произошел настоящий прорыв: от 50 до 90% пациентов с рецидивирующими и устойчивыми формами В-клеточных неоплазий, получившие терапию CD19 специфичными CAR Т-клетками, полностью излечиваются. Многими группами ведется

разработка CAR (химерных антигенных рецепторов), узнающих альтернативные В-клеточные мишени, например, CD20, CD22, BCMA – как для терапии других онкозаболеваний В-клеточного генеза, так и для помощи тем пациентам, кому введение CD19CAR Т-клеток не показано. В частности, в клинических испытаниях сейчас находятся два CD20-CAR, основанных на последовательностях мышиных антител Leu16 и 1F5 и отличающихся структурой используемых модулей. Тем не менее, пока не проведено систематических исследований, которые бы позволяли судить об относительной эффективности этих CD20-CAR, или были бы направлены на их структурную оптимизацию.

Целью данной работы было создание CD20-специфичного CAR на основе человеческого моноклонального антитела офатумумаб (2F2) и сравнение эффективности *in vitro* этого CAR и опубликованных CD20CAR (Leu16 и 1F5).

Экспериментальная часть. Для того чтобы корректно сравнивать эффективность различных CD20-специфичных CAR, было необходимо получить лентивирусные конструкции, кодирующие CAR, отличающиеся лишь антигенраспознающими модулями. В качестве основы для получения таких конструкций был использован лентивирусный вектор pCDH (CD530, SystemBio, США). На его основе нами были получены 6 лентивирусных конструкций, кодирующих три различных CD20-специфичных CAR “первого” и “второго” поколений (отличающихся наличием дополнительной костимулирующей последовательности). В качестве антигенраспознающих модулей в этих конструкциях были использованы последовательности scFv, заимствованные от человеческого антитела 2F2 (офатумумаб), а также мышиных антител 1F5 и Leu16.

Для проверки функциональности полученных CAR мы использовали две клеточные модели: человеческую Т-клеточную линию Jurkat и NK-клеточную линию YT. Выбор этих клеточных линий был обусловлен прежде всего тем, что обе эти линии легко трансдуцируются. Линию Jurkat традиционно используют для первичной выбраковки заведомо нефункциональных CAR, поскольку клетки этой линии крайне чувствительны к специфической и неспецифической активации. Однако эти клетки, в отличие от первичных Т-клеток или NK-клеточных линий, не проявляют значимой цитотоксичности. Поэтому для поэтапной характеристики полученных CAR-конструкций было решено провести анализ активационных свойств CAR на модели Jurkat, а цитотоксических свойств – на модели клеток линии YT.

Полученные лентивирусные конструкции, кодирующие CAR «первого» и «второго» поколений, были ко-трансфицированы в клетки линии HEK 293T вместе со вспомогательными плазмидами pMD2.G и psPAX2. В результате нами были получены 6 препаратов лентивирусных частиц, псевдотипированных VSV-G. Этими препаратами были трансдуцированы клетки линии Jurkat (CAR первого поколения) и линии YT (CAR второго поколения). Об эффективности заражения мы судили по экспрессии флуоресцентного репортера sorGFP и она составила >90% (Jurkat) и ~30% (YT). Затем мы убедились в том, что полученные CAR выходят на поверхность клеток Jurkat и YT: для этого мы провели их окрашивание конъюгатами против с-тус, поскольку этот эпитоп присутствует в структуре всех тестируемых CAR.

Был проведен активационный тест: в нем был измерен уровень экспрессии раннего маркера активации, белка CD69, на поверхности CD20-специфичных CAR-Jurkat клеток до и после инкубации с CD20+ клетками линии Raji. Как и ожидалось, клетки Jurkat, несущие CAR на своей поверхности успешно и специфически активировались.

Для того чтобы выяснить, проявляют ли полученные CAR-YT клетки специфическую цитотоксическую активность, эти клетки были смешаны с клетками-мишенями (Raji) в различных соотношениях. После 4-часовой совместной инкубации при помощи FACS-анализа был установлен процент гибели клеток-мишеней.

Результаты. Были получены 6 лентивирусных конструкций, кодирующих все комбинации модулей CAR: три различных CD20-специфичных scFv и два варианта сигнальных последовательностей. Используя эти конструкции, получены лентивирусные частицы и проведена трансдукция Т-клеток линии Jurkat и NK-клеток линии YT. В присутствии CD20+ клеток-мишеней, но не CD20- клеток, происходила специфическая активация клеток CD20CAR Jurkat. Более того, CD20CAR-YT клетки специфически лизировали клетки-мишени.

Заключение. Данные эксперименты свидетельствуют о том, что все полученные CD20-специфические CAR функциональны. Тем не менее, необходимо отметить, что 2F2(CD20)-CAR - созданный нами впервые – характеризуется наиболее удачным соотношением уровней специфической и неспецифической активации *in vitro*, что делает его более предпочтительным кандидатом для дальнейших испытаний на мышиных моделях.

ИНИЦИАЦИЯ ПРОРАСТАНИЯ СПОР *BACILLUS SUBTILIS* УЛЬТРАЗВУКОМ

С. С. Бойко

Научный руководитель: к.б.н., ведущий инженер инжинирингового центра «Промбиотех»

Е.С. Яценко

Алтайский Государственный Университет,

Россия, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, 656049

E-mail: sv.boyk@mail.ru

INITIATION OF SPORE GERMINATION OF *BACILLUS SUBTILLIS* ULTRASOUND

S. S. Boyko

Scientific Supervisor: PhD Leading Engineer of Engineering Center "Prombiotech" E.S. Yatsenko

Altay State University,

Russia, Barnaul, Lenin str, 656049

E-mail: sv.boyk@mail.ru

Abstract. Production of probiotics, produced by *Bacillus subtilis*, is popular in agriculture. Relevant studies are enhancing productivity and economic efficiency of the production of biological products. Growth and development acceleration *Bacillus subtilis*, by which probiotics are produced, possibly through physical action. One of the factors that can affect the microorganisms is ultrasound. The aim of the study is to examine the influence of ultrasound on hay bacillus spores. The study found the optimal exposure time ultrasound of a certain frequency in the debates strain *Bacillus subtilis* VKM B-3057 D to reduce the time of spore germination and increase the content of microorganisms during cultivation. The results of research can be used in the preparation of the seed and the control of microorganisms in the production of probiotics, and may be of interest to other researchers involved in the production biologics.

Введение. Комплексные кормовые биопрепараты, получаемые на основе *Bacillus subtilis*, являются востребованными продуктами в сельском хозяйстве. Производство таких препаратов не требует применения уникального и дорогостоящего оборудования и может быть осуществлено с использованием комплекса стандартных биотехнологических узлов и блоков. Тем не менее, продолжающееся развитие и интенсификация сельского хозяйства требуют поиска и разработки новых технологических приемов, позволяющих повысить продуктивность и экономическую эффективность производства биопрепаратов [1]. Ускорение роста и развития микроорганизмов возможно не только путем использования специфических биостимуляторов, но и посредством физического воздействия [2]. Одним из факторов, способным влиять на функциональное состояние микроорганизмов, является ультразвук (УЗ). Несмотря на то, что УЗ давно используют в различных отраслях науки, техники, медицины, его влияние на микроорганизмы требует более детального изучения. Ультразвуковые волны обладают большой механической энергией и вызывают ряд физических, химических и биологических явлений. Поэтому не случаен интерес к изучению влияния и механизмам действия этого физического фактора на биологические объекты [3]. Практическое применение УЗ развивается в двух направлениях: применение волн малой интенсивности (низкоэнергетические колебания, не приводящие к необратимым изменениям

в материалах и телах, через которые они распространяются); применение высокоэнергетических колебаний - волн высокой интенсивности для активного воздействия на вещества и изменения их структуры и свойств [4]. Целью данного исследования было изучение влияния ультразвука на споры сенной палочки. Полученные результаты исследования могут быть использованы при получении посевного материала и контроле содержания микроорганизмов в производстве пробиотиков, и могут представлять определенный интерес для других исследователей, занимающихся производством биопрепаратов для сельского хозяйства.

Материалы и методы. В качестве исходного штамма использовали штамм *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057 Д. Исследуемый биологический препарат представляет собой сухой порошок из лиофильно высушенных бактерий штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057 Д. Содержание спор бактерий составляет не менее 5×10^9 КОЕ/г. Для выращивания, поддержания и хранения культуры использовали агаризованную среду следующего состава (г/л): агар-агар – 18, дрожжевой экстракт – 5, пептон – 15, хлорид натрия – 5, дистиллированная вода – до 1 л (рН 6,8–7,0). Для культивирования использовали вегетативную среду (г/л): дрожжевой экстракт – 5, пептон – 15, хлорид натрия – 5, дистиллированная вода – до 1 л (рН 6,8–7,0).

Условия культивирования. Воздействие ультразвуком на споры проводили при температуре 32°C, частоте колебаний 37 кГц и мощности 140 Вт. Время воздействия составляло 1, 3, 5, 7, 15, 30 минут. Для каждой экспозиции использовались пробирки микроцентрифужные (Эппендорфа) объемом 1,5 мл, содержащие 0,1 г спор исследуемого штамма. Из обработанных спор готовили споровую суспензию. В колбу Эрленмейера, объемом 50 мл, содержащую 10 мл вегетативной среды, вносили 0,1 г спор. Культуру выращивали в колбах в шейкер-инкубаторе «Innova 44» (New Brunswick Scientific, США) при 250 об/мин (эксцентриситет 5 см), температуре 37°C в течение 24 часов [5]. Для выявления результата использовался метод посева на питательные среды (чашечный метод). В качестве контрольной пробы использовали споры штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057 Д без воздействия ультразвука. Результаты исследования показали, что способность микроорганизмов к размножению при посеве их на твердые питательные среды сразу после обработки ультразвуком при малом времени озвучивания усиливается (рис.1).

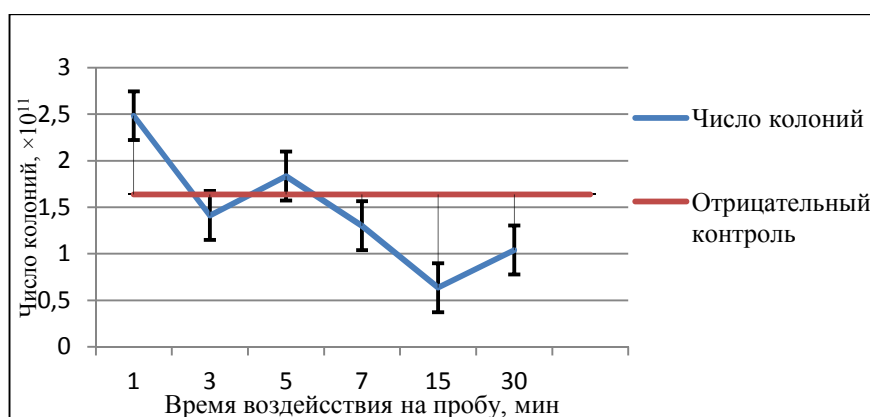


Рис. 1. Изменение численности микроорганизмов в процессе культивирования после воздействия ультразвуком

Согласно полученным данным, экспозиция в течение 1 минуты оказалась максимально эффективной, поскольку содержание микроорганизмов после культивирования составило в среднем $2,5 \times 10^{11}$ КОЕ/г, что достоверно больше отрицательного контроля на 40 %. Основываясь на этих данных, в дальнейшей работе использовали время экспозиции равное 1 мин.

При оценке влияния ультразвукового воздействия на прорастание спор были взяты споры, обработанные УЗ в течение одной минуты при частоте 37 кГц. Использовались пробирки микроцентрифужные (Эппендорфа) объемом 1,5 мл, содержащие 0,1 г спор исследуемого штамма. Из обработанных спор готовили споровую суспензию. В колбу Эрленмейера, объемом 50 мл, содержащую 10 мл вегетативной среды, вносили 0,1 г спор. Культуру выращивали в колбах в шейкер-инкубаторе «Innova 44» (New Brunswick Scientific, США) при 250 об/мин (эксцентриситет 5 см), температуре 37°C в течение 2 часов. Для оценки результатов использовался метод «раздавленной» капли. Для этого на предметное стекло наносилась капля культуры, накрывалась покровным стеклом [10]. Микроскопировался препарат с объективом 100X. Микроскопирование производилось каждые 15 минут с момента начала культивирования. Был использован бинокулярный микроскоп марки Альтами БИО 7. В ходе исследования было выявлено, что прорастание спор после воздействия ультразвуком происходит в 60-75 минут, у незвученных - 120 минут.

Вывод. В результате проведенного исследования установлено, что оптимальное время воздействия ультразвуком на споры штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057 Д для уменьшения времени прорастания спор и увеличения содержания микроорганизмов при культивировании составляет 1 минуту при температуре 32°C, частоте колебаний 37 кГц и мощности 140 Вт.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дурникин Д.А., Силантьева М.М., Ерещенко О.В. Перспективы применения ультразвукового мембранного экстрактора в технологии культивирования молочнокислых и пропионовых бактерий // Биологический вестник МДПУ имени Богдана Хмельницкого. – 2016. – №6 (2) – С. 21.
2. Дурникин Д.А., Силантьева М.М., Ерещенко О.В. Стимуляция ультразвуком биомассы молочнокислых и пропионовых бактерий при глубинном культивировании // Биологический вестник МДПУ имени Богдана Хмельницкого. – 2016. - №6 (2) – С.288
3. Антушева Т.И. Некоторые особенности влияния ультразвука на микроорганизмы // Живые и биокосные системы. – 2013. – №4 [Электронный ресурс]. – режим доступа: <http://www.jbks.ru/archive/issue-4/article-11> – 14.03.17
4. Пиротти Е.Л. Действие ультразвуковых колебаний на биологические объекты // Вестник ХНТУСГ, 2012 – 130 [Электронный ресурс]. – режим доступа: http://www.khntusg.com.ua/files/sbornik/vestnik_130/41.pdf - 14.03.17
5. Савушкин В.А., Джавахия В.В. и др. Разработка высокоактивного штамма-продуцента вирджинииамицина и повышение его продуктивности с помощью синтетических абсорбирующих смол // Биологический вестник МДПУ имени Богдана Хмельницкого. – 2016. – №6 (3) – С.198

УПРАВЛЯЕМАЯ НИТРИФИКАЦИЯ

Е.Н. Бурнашова^{1,2}

Научный руководитель: доцент, канд. биол. наук С.Ю. Семёнов²

¹Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и торфа – филиал
Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий Российской академии наук,

Россия, г. Томск, ул. Гагарина, 3, 634050

²Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

E-mail: lichtgestalte@mail.ru

CONTROLLED NITRIFICATION

E.N. Burnashova^{1,2}

Scientific Supervisor: Assistant professor, Ph.D. S.Y. Semyonov²

¹Siberian Research Institute of Agriculture and Peat – branch of the Siberian Federal Science Centre of
Agrobiotechnologies, Russia, Tomsk, Gagarina str., 3, 634050

²National Research Tomsk State University,

Russia, Tomsk, Lenina str., 36, 634050

E-mail: lichtgestalte@mail.ru

Abstract. *In the present study we investigated a method of controlled nitrification. The technique may significantly reduce the cost of implementation of the nitrification process. The obtained results confirmed the effectiveness of the proposed method.*

Введение. В настоящее время одним из важнейших направлений природоохранной деятельности является предупреждение загрязнения природных водоемов веществами группы азота, источниками которых являются стоки животноводческих предприятий, хозяйственно-бытовые сточные воды и стоки ряда промышленных предприятий. Сброс таких стоков в природные водоемы оказывает токсическое воздействие на гидробионтов. Одним из этапов очистки сточных вод от азотных загрязнений является процесс нитрификации, результатом которого является конверсия аммоний-ионов в нитрат- и нитрит-ионы. Аммоний более чем в 20 раз токсичнее для гидробионтов, чем нитрат-ион. Поэтому даже при полном отсутствии в конкретной технологии этапа денитрификации, нитрификация может снизить кратность превышения ПДК по азотному загрязнению от 5,8 раз и выше. В то же время степень трансформации аммония до концентраций ниже ПДК не только не нужна, но и даже вредна, т.к. при этом в сточных водах часто увеличивается содержание наиболее токсичной формы азота – нитрит-иона (ПДК_{рх} по азоту - 0,02 мг/л). Таким образом, в практике очистки сточных вод существует потребность в сооружениях и способах управляемой нитрификации, обеспечивающих оптимизацию очистки стоков по соотношению аммоний-нитрат. В системах с активным илом такие технологии известны. Для биофильтров такие решения отсутствуют.

Управляемая нитрификация является ключевым этапом в реализации наиболее прогрессивной в настоящее время технологии анаэробного окисления аммония (ANAMMOX), том числе в системах

“constructed wetlands” [1]. Таким образом, целью работы является разработка способа управляемой нитрификации в биофильтрах.

Материалы и методы исследования. Лабораторный ферментер, осуществляющий управляемую нитрификацию, представляет собой цилиндрическую емкость диаметром 10 см и высотой 1,75 м. Внутри реактора-нитрификатора расположена перфорированная трубка диаметром 2 см, позволяющая контролировать уровень заполнения биореактора стоками, концентрации ионов аммония, нитратов, растворенного кислорода. Емкости разделены между собой слоем гравия фракции 5-20 мм. Рабочий объем биореактора составляет 5,7 л, сточные воды подаются насосом нисходящим потоком со скоростью 1 л/ч. Для осуществления лабораторных исследований процесса нитрификации использовали минеральную среду на водопроводной воде, в состав которой входили $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, концентрация иона аммония составляла 31 мг/л.

Наращивание в реакторе биопленки с бактериями-нитрификаторами осуществлялось в течение двенадцати недель в режиме обычного биофильтра с рециркуляцией стоков до достижения 97-процентной трансформации аммония в окисленные формы азота. Для контроля эффективности очистки использовали фотометрические и ионометрические методы определения концентрации иона аммония и нитратов. Математическая обработка результатов измерений выполнялась с использованием программы Excel.

Результаты. В экспериментальном исследовании изучалась зависимость степени окисления аммония от уровня заполнения реактора сточными водами, используя периодические затопления и сбросы стоков (приливно-отливной системы «Tidal-flow» [2]) в биореакторе, осуществляющем процесс нитрификации. Положение колена сифона определяет время экспозиции стоков в биореакторе, а так же время контакта и величину поверхности фильтрующей загрузки, на которой иммобилизована биопленка, контактирующей с атмосферным воздухом. Срабатывание сифона на сброс при максимальном заполнении биофильтра обуславливает наименьшую степень нитрификации, и наоборот, включение сифона при минимальном заполнении реактора обеспечивает наибольшую эффективность трансформации аммония в окисленные формы азота.

Измерения проводились при 5 разных положениях колена сифона (48, 73, 103, 133, 153 см от дна, причем 8 см от дна являлась «мертвой зоной») для выявления изменения динамики концентраций аммония и нитратов.

Результаты опытов изменения концентрации аммония показывают (таблица 1), что с повышением уровня колена сифона ожидаемо сокращается окислительная мощность.

Таблица 1

Средняя концентрация аммония (мг/л) в сточных водах после очистки в реакторе-нитрификаторе при разных положениях колена сифона

Положение колена сифона, (см)	Средняя концентрация, (мг/л)	Эффективность удаления, (%)
48	0,9	97
73	5,4	82
103	7,7	75
133	11,6	62
153	14,7	52

Установлено, что максимальная эффективность удаления аммония составляет 97 % при минимальном уровне колена сифона 48 см, с повышением уровня до 153 см – снижается до 52%. Средняя концентрация ионов аммония варьируется от 0,91 до 14,71 мг/л.

Результаты измерения концентрации нитратов (таблица 2) показывают, что с повышением уровня колена сифона сокращается образование нитратов в сточных водах. Установлено, что максимальная концентрация нитратов образуется при минимальном уровне колена сифона 48 см. и составляет 101,29 мг/л, с повышением уровня до 153 см – снижается до 53,89 мг/л.

Таблица 2

Средняя концентрация нитратов (мг/л) в сточных водах после очистки в реакторе-нитрификаторе при разных положениях колена сифона

Положение колена сифона, (см)	Средняя концентрация, (мг/л)
48	101,3
73	85,7
103	77,9
133	64,7
153	53,9

Пересчет концентраций ионов аммония и нитратов на их концентрацию по азоту показывает практически полную сбалансированность процесса по азоту. При понижении уровня расположения колена сифона от максимального до минимального концентрация аммония в очищенных стоках изменялась от 23 мгN/л до 11 мгN/л, а концентрация нитратов от 11 до 23 мгN/л, что показывает отсутствие в реакторе процесса денитрификации, что и ожидалось в эксперименте, т.к. в составе модельных стоков нет органического вещества, необходимого для денитрификации. Очевидно, что при более длительном течении процесса в системе сформируется автохтонная органика из биомассы нитрификаторов и появятся признаки денитрификации.

Заключение. В ходе экспериментов выявлено, что технология «Tidal-flow» в сочетании с сифонным выпуском очищенных стоков позволяет управлять степенью нитрификации аммония путем изменения положения колена сифона. При превышении заданной эффективности нитрификации колена сифона следует поднять, при недостаточной эффективности – опустить. Такой алгоритм управления может быть автоматизирован с использованием простой системы регулирования, включающей датчики концентрации иона аммония (электродный) и расхода воды на входе в реактор и электродвигатель, поднимающий (опускающий) шток, на котором закреплено колено сифона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zeqin Dong, Tieheng Sun. A potential new process for improving nitrogen removal in constructed wetlands—Promoting coexistence of partial-nitrification and ANAMMOX // Ecological engineering. – 2007. – Vol. 31. – P. 69–78.
2. Austin D., Lohan E., Verson E. Nitrification and denitrification in a Tidal vertical Flow wetland pilot // Proceedings of the Water Environment Technical Conference. Los Angeles. – 2003.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ
НОВОГО АНТИКОАГУЛЯНТА ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ**

Н.Н. Буслаева, Д.И. Бояринцев

Научный руководитель: к.б.н. Е.П. Калинин

Тюменский государственный медицинский университет

Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54, 625023

E-mail: natalie.buslaeva@gmail.com

**PREPARATION AND EXPERIMENTAL EFFICIENCY MARK OF
NEW DIRECT ANTICOAGULANT**

N.N. Buslaeva, D.I. Boyarintsev

Scientific Supervisor: Ph.D. E.P. Kalinin

Tyumen State Medical University, Russia, Tyumen, Odesskaya str., 54, 625023

E-mail: natalie.buslaeva@gmail.com

Abstract. *Compounds with anticoagulant activity have been extracted from plant (Vaccinium myrtillus). The action of effectors realize at intrinsic way of blood coagulation. In this work we study influences of new plant-derived direct anticoagulant in vitro and in vivo (in laser-induced model of thrombosis) at hemostasis and hemodynamics and compare its effects with heparin.*

Введение. В лабораториях Тюменского ГМУ из растений, произрастающих в Западной Сибири, получены экстракты, обладающие антикоагулянтной активностью [1]. Существующие данные говорят о высокой противосвертывающей активности растительных эффекторов, приемлемой продолжительности действия и низкой токсичности [2, 3]. Однако их влияние на гемостаз оценено, главным образом, с использованием «пробирочных» тестов, а для тестирования использовались суммарные экстракты, без выделения действующего вещества, что делает моделирование претромботических и тромботических состояний для оценки их противосвертывающей активности актуальным.

Материалы и методы исследования. Антикоагулянт получали из листьев черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus*) по разработанной в нашей лаборатории оригинальной методике. Оценку показателей свертывания крови (активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ) и протромбиновое время (ПВ)) проводили на автоматическом коагулометре «Solar» (Беларусь) с использованием стандартных тест-систем. Агрегацию тромбоцитов исследовали с помощью анализатора «Biola-LA 230» (Россия) и наборов «Технология-Стандарт» (Россия). Исследование деформируемости эритроцитов проводили методом эктацитометрии в проточной камере. Для тестирования антикоагулянта *in vivo* использовали самцов белых беспородных крыс. Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности (директива 86/609/ЕЕС и «Хельсинкская декларация» (1996)). Все манипуляции проводились под общим наркозом, по завершении эксперимента животное декапитировали не выводя из состояния сна. Влияние раствора антикоагулянта оценивали после его введения в яремную вену. Лазер-индуцированный тромбоз моделировали на прижизненном препарате сосудов брыжейки тонкого кишечника, с видеофиксацией изменений. Для облучения

использовали полупроводниковый лазер (535 нм, 50 мВт), время воздействия от 30 до 180 секунд, диаметр светового пятна – 30-40 мкм. В качестве объектов воздействия выбирались артериолы и вены диаметром 25-50 мкм. Во всех экспериментах сравнивали результаты с контрольной группой животных. Статистический анализ данных выполняли методами вариационной статистики для малых рядов наблюдений. Статистическую значимость оценивали, используя U-критерий Манна-Уитни, значимыми считались отличия при значениях $p < 0,05$.

Результаты. В качестве сырья для получения антикоагулянтов использовали листья черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus*). Сухое измельченное сырье экстрагировали гидроксидом аммония, полученный экстракт отфильтровывали, порции экстракта объединяли, концентрировали, отдиализовывали, недиализуемую часть высушивали. Полученный экстракт в Трис-HCl буфере (pH 7,2) в сравнении с контролем дозависимо удлинял АЧТВ, ПВ и ТВ (рис.1). Наибольшую активно раствор экстракта черники угнетал АЧТВ (в концентрации 2,5 мг/мл эффективность торможения $i = 0,65$). Последующее разделение экстракта провели гель-фильтрацией (Toyopearl HW-40, Fine колонка 500X10 мм, элюент 0,25 мМ ацетатно-аммонийный буфер (pH 7,6)). Удалось разделить экстракт черники на 6 фракций, из которых наиболее активной оказалась фракция 1 (рис.2.).



Рис. 1. Зависимость эффективности торможения плазмокоагуляции от концентрации экстракта

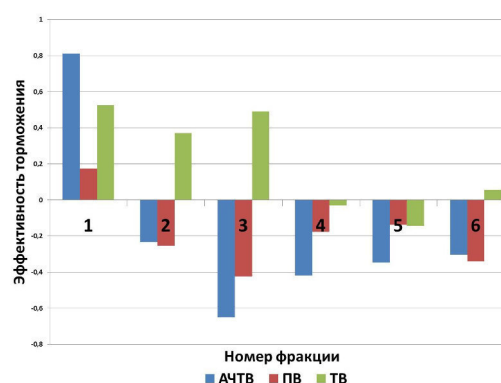


Рис. 2. Противосвертывающая активность фракций экстракта

После введения экстракта в кровоток крыс через 5, 30 и 90 мин осуществляли отбор проб крови, получали богатую и бедную тромбоцитами плазму, используя её для оценки АЧТВ и АТ. В течение времени наблюдения сохранялось выраженное ($i = 0,17 \pm 0,003$) торможение АЧТВ. Также, в сравнении с контролем, на $14,4 \pm 0,1\%$ снижалась интенсивность АДФ-индуцированной АТ, и на $15 \pm 2,3\%$ повышалась деформируемость эритроцитов. При моделировании тромбоза индуцированного лазерным излучением фиксировали изменение скорости кровотока и диаметра сосудов микроциркуляторного русла. В контрольной группе уже на первых секундах облучения наблюдалось увеличение скорости кровотока, а уже через 30 секунд скорость кровотока замедлялась и увеличивалась зернистость потока (рис.3). При увеличении продолжительности облучения до 90-180 секунд отмечалась вазодилатация и выраженная миграция лейкоцитов в зону повреждения (рис.4). В дальнейшем наблюдается адгезия и агрегация форменных элементов с формированием пристеночного тромба, а затем и полная остановка кровотока вследствие закупорки им сосуда (рис.5).

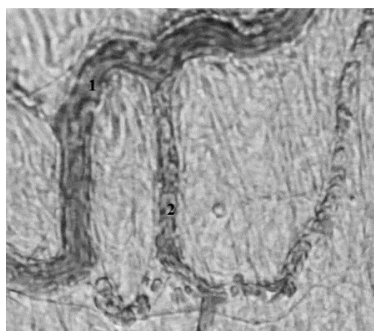


Рис. 3. Изменение скорости кровотока через 30 секунд от начала облучения (1 – нормальный кровоток, 2 – замедление кровотока).

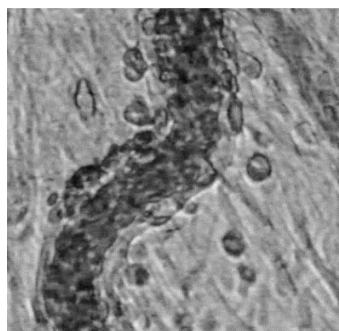


Рис. 4. Миграция лейкоцитов в очаг повреждения через 60-90 секунд от начала облучения.

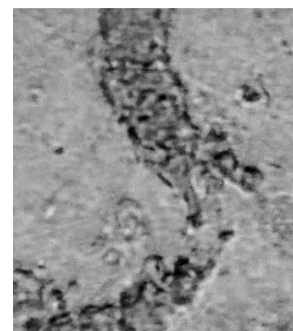


Рис. 5. Тромбоз сосуда через 150-180 секунд от начала облучения.

В сравнении с контрольной группой на фоне предварительного введения гепарина потребовалось увеличить время облучения до 360 секунд, полной остановки кровотока не наблюдалось, а гемодинамика восстанавливалась через 15 минут после прекращения воздействия. При предварительном введении животным исследуемого экстракта листьев черники продолжительность облучения, необходимая для нарушения гемодинамики, составила 300 секунд. По сравнению с контролем увеличилось время развития гемодинамических нарушений, снизилась скорость тромбообразования, а остановка кровотока была временной (восстановление через 12-18 минут).

Закключение. Полученные в ходе исследования результаты позволяют утверждать, что из листьев черники может быть получен антикоагулянт, выраженно угнетающий реакции внутреннего пути плазмокоагуляции в тестах *in vitro* и *in vivo*. Преимущественное влияние антикоагулянта на АЧТВ, и фактически исчезающее при разбавлении влияние на ПВ и ТВ свидетельствует о специфичном торможении активности факторов внутреннего пути плазмокоагуляции, однако точка приложения эффекта, а также детали механизма угнетения свертывания эффектором нами пока не уточнены. Продолжительность действия полученного антикоагулянта составляет не менее 1,5 часов, а его внутривенное введение не приводит к гибели животного. Как и официальный прямой антикоагулянт – гепарин, исследуемый антикоагулянт снижает активность развития тромботических реакций при моделировании тромбоза. Кроме влияния на плазмокоагуляционный гемостаз, антикоагулянт ограниченно угнетает агрегацию тромбоцитов и повышает эластичность мембран эритроцитов, что позволяет говорить о его мембранопротекторных свойствах. Последнее утверждение требует детального исследования, в первую очередь – уточнения механизма наблюдаемых эффектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Русакова О.А. Растения флоры Сибири, как источники антикоагулянтов прямого действия // В сб.: Обмен веществ в норме и патологии. - Тюмень, 1992. - С. 84.
- 2 Губаев А. Г. Фармакологические свойства антикоагулянта прямого действия из травы ноней темная: автореф. дисс. канд. мед. наук. – Тюмень, 1996. – 20 с.
- 3 Дементьева И.А., Леонова О.П., Умутбаева М.К. Препарат противосвертывающего действия из медуницы мягчайшей // Молодежь – практ. здравоохранению: Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. мол. ученых. - М., 1990. - С. 42-43.

**ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИИ ГЕНОВ *IL10* (RS1800872) И *TNFA* (RS2239704) С РАЗВИТИЕМ
ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ**

Д.Е. Гомбоева, И.Ж. Жалсанова

Научный руководитель: к.б.н., Е.Ю. Брагина

Сибирский Государственный Медицинский Университет,

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

НИИ медицинской генетики ТНИМЦ,

Россия, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10, 634050

E- mail: gombo-d@mail.ru

**ASSOCIATION STUDY OF GENES *IL10* (rs1800872) AND *TNFA* (rs2239704) IN DEVELOPMENT OF
PULMONARY TUBERCULOSIS**

D.Ye. Gomboeva, I.Z. Zhalsanova

Scientific Supervisor: PhD. Bio. Sc., E. Yu. Bragina

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, 2 Moskovsky trakt, 634055

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

E-mail: gombo-d@mail.ru

Abstract. *Tuberculosis (TB) is the most dangerous widespread infectious disease in the world caused by Mycobacteria tuberculosis. Genetic factors are important in the development of TB. Defense against TB infection is provided through T- cell host immunity. Resistance to Mycobacteria tuberculosis is determined by T helper type 1 (Th1) cells and their cytokines. Cytokine spectrum of Th-1 is represented by proinflammatory cytokines: interferon gamma (IFN γ), interleukin-12, interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha (TNFa). On the other hand Th-2 response characterized by the secretion of cytokines (interleukin-4 and interleukin-10) is associated with the lack of protection in TB. Thus Th-1/Th-2 balance is very important for definition the outcome of infection disease. In this study we take into account of genetic polymorphisms IL10 (rs1800872) and TNFa (rs2239704) in TB patients and healthy individuals. Results of genotyping and statistical comparison have shown a strong significance association of IL10 and TNFa with susceptibility to pulmonary TB in Tomsk population.*

Актуальность. Туберкулез (ТБ) – хроническое инфекционное заболевание, возбудителем которого является *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ). По данным Всемирной организации здравоохранения туберкулезом инфицировано 1/3 населения планеты [1], каждый год инфицируется около 9 млн человек и умирают 2 млн человек [2]. Несмотря на повсеместное распространение МБТ, заболевают ТБ 10% всех инфицированных людей [3]. ТБ является мультифакторным заболеванием, в развитии которого принимают участие генетические и средовые факторы. Вклад генетической компоненты был доказан, прежде всего, результатами близнецовых исследований: так, уровень конкордантности у монозиготных близнецов в 2 раза выше, чем у дизиготных [4]. Известно, что частота заболевания ТБ у родственников пробанда выше даже в случаях, когда родственники не находятся в семейном контакте с пробандом. Кроме этого существуют данные о накоплении числа случаев

заболевания ТБ в семьях с близкородственными браками. В настоящее время для изучения генетической предрасположенности к ТБ наряду с другими активно используется ассоциативный анализ [5], который предполагает поиск генов – кандидатов, вовлеченных в процесс иммунного ответа на МТБ и формирование начальной воспалительной реакции на патоген. К их числу можно отнести гены, кодирующие главный комплекс гистосовместимости (МНС), цитокины, хемокины [6]. На сегодняшний день по данным электронной базы HuGe Navigator (<https://www.cdc.gov/genomics/hugenet/hugenavigator.htm>) известно 412 генов-кандидатов развития ТБ.

Защита организма против МБТ реализуется посредством клеточного иммунитета. Решающая роль в этом принадлежит регуляторным и цитотоксическим лимфоцитам. Причем, протективный иммунитет к МТБ формируется за счет функционирования Т-хелперов 1-го типа (Th-1), к спектру которых в основном относятся провоспалительные цитокины: интерферон гамма (IFN γ), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-2 (IL-2), фактор некроза опухоли альфа (ФНО α , или TNF α - tumor necrosis factor) [7]. С другой стороны у пациентов с туберкулезом наблюдаются выраженные отличия в содержании цитокинов Т-хелперов 2-го типа, включая интерлейкин-10 (IL-10) и интерлейкин-4 (IL-4) [8]. Таким образом, большое значение имеет тонкая регуляция Th-1/Th-2 баланса, определяющего исход туберкулезной инфекции.

Цель исследования: изучить ассоциацию полиморфных вариантов генов *IL10* (rs1800872) и *TNF α* (rs2239704) с развитием туберкулеза в популяции г.Томска.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования были образцы геномной ДНК больных ТБ (n=230) и здоровых индивидов (n=216) в качестве группы сравнения из банка данных НИИ медицинской генетики. Средний возраст в группе больных ТБ составил $48,06 \pm 1,06$ лет, а в группе здоровых – $45,56 \pm 1,29$ лет. ДНК экстрагирована из лейкоцитов периферической крови по стандартной неэнзиматической методике. Генотипирование полиморфного варианта гена *IL10* (rs1800872) производилось методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ), включающего в себя амплификацию на термоциклере Терцик («ДНК- Технология», Россия) и рестрикцию эндонуклеазой рестрикции Rsa I («СибЭнзим», Россия). Разделение рестрицированных фрагментов проводили с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Детекцию результатов производили в УФ- камере E-Box VX2 («Vilmer Lourmat», Франция). Генотипирование полиморфного варианта гена *TNF α* (rs2239704) проводили методом ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 Touch («BioRad Laboratories», США) с применением реактива TaqMan SNP («Applied Biosystems», США). Статистическую обработку данных производили с применением программы Excel MS. Для анализа ассоциаций полиморфных вариантов генов с ТБ использовали критерий χ^2 , различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. Наблюдаемое распределение генотипов в контрольной группе соответствовало ожидаемым при равновесии Харди- Вайнберга для полиморфизма rs1800872 гена *IL10* ($\chi^2=0,034$; $p=0,854$). В то же время для полиморфизма rs2239704 гена *TNF α* наблюдаемое распределение генотипов отличалось от ожидаемого ($\chi^2=5,07$; $p=0,024$). Ген *IL-10* локализован на длинном плече 1 хромосомы в регионе 31-32 и состоит 5 экзонов и 4 интрона [9]. В промоторной области гена было обнаружено 3 однонуклеотидные замены (-1082, -819, -592), для которых доказана корреляция с уровнем продукции IL-10 [10]. Полиморфный вариант гена *IL-10* (rs1800872) представляет собой однонуклеотидную замену

T/C, расположенную в регуляторной области гена, с частотой минорного аллеля до 24% у европеоидов (по данным базы данных Ensembl). В группе больных ТБ по *IL10* (rs1800872) частота генотипа СС составила 56,52%, генотипа АС - 36,52%, генотипа АА - 6,96%. Сравнение частот генотипов у больных ТБ с контрольной группой выявило статистически значимые различия ($\chi^2=5,45$; $p=0,020$).

TNF имеет значение в формировании гранулем, индукции активности макрофагов, ограничении распространения и размножения МБТ [11]. Ген *TNF α* расположен на коротком плече 6 хромосомы, регионе 21 и содержит 4 экзона [12]. По данным базы данных Ensembl в гене идентифицированы 260 однонуклеотидных полиморфизмов. Полиморфизм rs2239704 представляет собой однонуклеотидную замену А/С с частотой минорного аллеля до 41% в европейских популяциях. Частота генотипа СС для изученного варианта гена *TNF α* (rs2239704) в группе больных ТБ составила 30,95%, генотипа АА – 25%, генотипа АС- 44,05%. Сравнение частот генотипов по *TNF α* между группами больных и здоровых индивидов также выявило статистически значимые различия ($\chi^2=5,95$; $p=0,015$).

Выводы. Таким образом, полиморфные варианты генов *IL10* (rs1800872) и *TNF α* (rs2239704) ассоциированы с предрасположенностью к ТБ легких в популяции г.Томска.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raviglione, M., Snider, D., Kochi, A. (1995) Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *Journal of the American Medical Association*, no. 273, pp. 220–226.
2. WHO. Global tuberculosis report 2013. Geneva: WHO Press: 2013.
3. Sudre, P., ten Dam, G., Kochi, A. (1992) Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bulletin of the World Health Organisation*, no. 70, pp. 149–59.
4. Kallman, F. J., Reisner, D. (1943) Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis. *American review of tuberculosis*, no. 47, pp. 549 – 574.
5. Рудко А. А., Фрейдин М. Б., Пузырев В. П. Наследственная предрасположенность туберкулезу // Молекулярная медицина. – 2011. - №3. – С. 3 – 10.
6. Громова А. Ю., Симбирцев А. С. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека// Цитокины и воспаление. – 2005. – Т.4. – №2. – С.1 – 12.
7. Pai, M., Zwerling, A., Menzies, D. (2008) Systematic Review: T-Cell – Based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. *Annals of Internal Medicine*, vol. 149, no. 3, pp. 177 – 184.
8. Bai, X., Wilson, S. E., Chmura, K., et al. (2004) Morphometric analysis of Th(1) and Th(2) cytokine expression in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, vol. 84, no. 6, pp. 375-385
9. Spits, H., de Waal, Malefyt R. (1992) Functional characterization of human IL-10. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, vol. 99, pp. 8–15.
10. Lyer, S. S., Cheng, G. (2012) Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, vol. 32, pp. 23 – 63.
11. Crevel, R., Ottenhoff, N. M., Meer, W. M. (2002) Innate immunity to mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Review*, vol. 15, no. 2, pp. 294–309.
12. Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Chan, J., et al. (1995) Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity*, vol. 2, pp. 561–572.

**КАРИОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ
ЧЕЛОВЕКА В ПЕРИОД ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ СОЛНЦА**

А.А. Гороховский, В.Н. Котова

Научный руководитель: проф., д-р биол. наук Н.Н. Ильинских

Сибирский государственный медицинский университет,

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

E-mail: alegorohovs@yandex.ru

**KARYOPATHOLOGICAL CHANGES IN THE HUMAN BUCCAL EPITHELIAL CELLS DURING
THE PERIODS OF INTERCHANGING SUN ACTIVITY**

A.A. Gorokhovsky, V.N. Kotova

Scientific Supervisor: Prof., Dr. N.N. Ilinskikh

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

E-mail: alegorohovs@yandex.ru

***Abstract.** The following article describes the effects of solar flares on a healthy person's cells' nuclear apparatus. The issue was not talked earlier, nevertheless the answer will enable us to calculate the negative effects of the above mentioned factor on the cytogenetic complex. Using visual and statistical analysis, a significant increase in cell size with double nuclei during particular time intervals was detected. The particular fact might serve as indirect proof of the hypothesis of solar radiation mutagenicity on human cells' nuclear apparatus.*

Введение. Еще в начале 20 века советский ученый А. Л. Чижевский, исследуя воздействие космоса на земные организмы, заметил, что для всего живого «существенное значение имеет не только ежедневно излучаемая Солнцем энергия, но и периодически возникающие изменения «солнцедетельности», или солнечной активности». В своих работах он продемонстрировал ряд интересных закономерностей, например, установил прямую связь между периодичностью вспышек эпидемий и пандемий с возмущениями физических факторов внешней («космо-теллурической») среды, установил параллелизм в ходе кривых общей смертности и деятельности Солнца и многое другое [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. С тех пор появилось значительное число научных работ, свидетельствующих о влиянии солнечной активности на морфофункциональную активность организма человека и животных. Сегодня встречаются самые разнообразные данные такие как: существование зависимости между кислотностью желудочного сока и степенью солнечной активности, влияние ее на фагоцитоз, уровень лейкоцитов и способность крови к свертыванию [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Имеются также единичные работы о том, что в годы активного Солнца повышена рождаемость генетических аномалов [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Однако исследований, показывающих связь между активностью Солнца и кариопатологическими изменениями клеток человека, в доступной литературе нам не известно.

Настоящая работа поставлена с целью изучения связи частоты наблюдаемых форм кариопатологически измененных буккальных эпителиоцитов в период спокойного и активного Солнца у

здоровых людей, что может указывать о влиянии его на цитогенетические структуры, а следовательно, и общее состояние человека.

Материалы и методы исследования. Состояние генетического гомеостаза было оценено при помощи микроядерного теста в буккальном эпителии, который широко используется для определения влияния различных факторов на генетическую стабильность организма.

Для исследования были использованы образцы буккального эпителия, взятые у 15 студентов Сибирского государственного медицинского университета, в возрасте от 17 до 20 лет. Сбор материала осуществлялся за 21 день до солнечной вспышки и спустя 3 и 7 дней после неё; с помощью шпателя, предварительно обработанного спиртом, был сделан соскоб слизистой оболочки щек выше линии смыкания зубов и взятый материал нанесён на стекло и высушен на воздухе. Мазки буккального эпителия, фиксировались в жидкости Карнуа и для окрашивания препаратов использовали красители азур-эозин по Романовскому-Гимза.

Все обследованные дали документированное согласие на проведение настоящего исследования. У каждого человека анализировали не менее 2000 эпителиоцитов. Всего было проанализировано 90000 клеток, из них с нарушениями 1524 клетки. На каждом препарате определяли частоту клеток с микроядрами, кариорексисом, кариолизисом, кариопикнозом и наличие двух ядер. Фиксировались выраженные изменения формы ядра. Для морфологически нормального ядра буккального эпителиоцита характерна круглая, либо овальная форма с полным сохранением целостности оболочки.

За микроядро принимали «хроматиновое тело округлой или овальной формы с гладким непрерывным краем, размером не более 1/3 ядра, лежащее отдельно от последнего, не преломляющее свет и имеющее интенсивность окрашивания и рисунок хроматина, как у основного ядра, и находящееся в одной с ним плоскости. Двухядерная клетка – клетка с двумя отдельно лежащими ядрами. Кариопикноз – дегенеративное изменение ядра, сопровождающееся уменьшением его размера не менее чем в 2 раза, уплотнением, гомогенным и интенсивным окрашиванием. Кариорексис – дегенеративное изменение ядра в клетке, сопровождающееся распадом его на отдельные интенсивно окрашенные части с гомогенной структурой. Морфологически кариорексис представляет собой клетку с несколькими крупными или многочисленными мелкими плотными окрашенными фрагментами ядра в цитоплазме. Кариолизис морфологически представляет собой клетку с гомогенной бледной окраской ядра и нечеткой, разрушающейся кариолеммой (ранняя стадия кариолизиса) или клетку с полным отсутствием окраски ядра, когда на фоне окрашенной цитоплазмы она имеет вид тени (полная стадия кариолизиса)» [0].

Данные об активности Солнца были получены на сайте обсерватории ТЕСИС Лаборатории рентгеновской астрономии Солнца ФИАН им. П. Н. Лебедева.

Статистическую обработку осуществляли с использованием метода Манна-Уитни. Анализ статистических различий качественных признаков производили с использованием теста χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность. Различия сравниваемых результатов ($X \pm m$, где X – выборочное среднее арифметическое, m – ошибка среднего арифметического) считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Полученные данные свидетельствуют (табл.1), что существует некая связь в уровне кариопатологических изменений в клетках буккального эпителия у здоровых людей в зависимости от периода Солнечной активности. Среди наблюдаемых aberrаций значимые изменения ($p < 0,01$)

происходили среди клеток обладающих двуядерностью (бинуклеарные клетки). Причем отмечены они были на 3 сутки от начала солнечной вспышки. Через 7 суток отмечена нормализация параметра. Статистически значимых изменений не претерпевают остальные показатели: кариорексис, кариопикноз, кариолизис и частота клеток с микроядрами ни через 3, ни через 7 суток после повышения солнечной активности.

Таблица 1

Частота патологически измененных клеток буккального эпителия в период спокойного и активного Солнца у здоровых людей

Типы патологий	Контроль	Опыт (через 3 дня)	Р	Опыт (через 7 дней)	Р
Кариопикноз	2,40±0,52	1,73±0,36	p>0,05	1,73±0,35	p>0,05
Кариорексис	2,33±0,45	3,06±0,58	p>0,05	2,66±0,47	p>0,05
Кариолизис	25,40±7,47	24,73±4,47	p>0,05	11,06±2,30	p>0,05
Двуядерность	4,8±0,66	10,33±1,14	p<0,01	7,80±1,06	p>0,05
Микроядра	1,06±0,30	1,26±0,20	p>0,05	1,20±0,36	p>0,05

Выводы. Полученные данные свидетельствуют, что существует прямая зависимость в уровне кариопатологических изменений в клетках буккального эпителия у здоровых людей от периода солнечной активности. Обнаружено, что через 3 суток после ее возрастания в эпителии слизистой рта человека наблюдается значимое увеличение числа двуядерных клеток, однако эти изменения краткосрочны и уже через 7 суток отмечена нормализация по этому показателю. Рост бинуклеарных клеток доказывает негативное влияние «солнцедетальности» на цитогенетические структуры, что в свою очередь может отразиться на состоянии здоровья человека, особенно на лицах с хроническими, вялотекущими заболеваниями. Таким образом, можно поставить гелиофактор в один из критериев профилактики развития и обострения болезней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калаев В.Н. Микроядерный тест буккального эпителия ротовой полости человека: монография. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2016. – 136 с.
2. Земное эхо солнечных бурь / Под ред. П.А. Коржуев. – М.: Мысль, 1976. – 367 с.
3. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность / Под ред. Н.Н. Ильинских. – Томск: Изд-во ТГУ, 1991. – 272 с.
4. Конюшая Ю.П. Открытия советских ученых. – М.: Московский рабочий, 1979. – 688 с.

"ЭКГ-ЭКСПРЕСС" - ПОРТАТИВНОЕ УСТРОЙСТВО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СЕРДЦА ЧЕЛОВЕКА

Д.О. Дементьев, А.А. Бояхчан, А.А. Уваров

Научный руководитель: к.т.н., доцент каф. ПМЭ И.А. Лежнина

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

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

E-mail: denis.dementev.00@mail.ru

"ECG-EXPRESS" - PORTABLE DEVICE FOR DIAGNOSIS OF HUMAN HEART

D.O. Dementiev, A.A. Boyakhchyan, A.A. Uvarov

Scientific Supervisor: Ph.D. I.A. Lezhnina

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

E-mail: denis.dementev.00@mail.ru

Abstract. *This article presents the results of experiments comparing the silver chloride electrode and capacitive sensors, portable electrocardiograph "ECG-Express." Here is an analogy of the electrocardiograph.*

Введение. В течение многих десятилетий сердечно-сосудистые заболевания лидируют в мировой смертности, которая составляет более 17 млн. человек в год. Из них 50% смертей от ССЗ приходится на внезапную смертность, которая в 80% начинается с аритмии и фибрилляции сердца [1]. Аритмия носит эпизодический характер и проявляется достаточно хаотично. Для диагностирования и регистрации подобных нарушений ритма работы сердца требуется быстрая реакция. В клиниках это возможно, но, только при условии постоянного подключения к стационарному электрокардиографу. Данная проблема активно решается в настоящий момент по всему миру. Так, например, компания AliveCor недавно продемонстрировала прибор в виде чехла, предназначенного для смартфона «Iphone». В чехол встроены специальные датчики, для измерения ЭКГ. Это мобильное устройство дает возможность получить ЭКГ с ограниченного количества отведений (1-3) в любых условиях и передавать данные через интернет лечащему врачу.

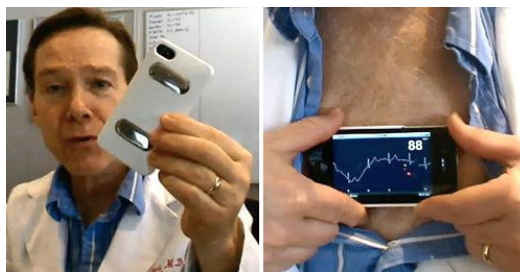


Рис. 1. ЭКГ чехол

ИМЕС, Бельгийский/Нидерландский исследовательский центр нанoeлектроники и нанотехнологий, разработал нечто, что можно описать как «беспроводной, гибкий и растягиваемый» ЭКГ пластырь для комфортного и продолжительного кардиомониторинга. ЭКГ пластырь - система, выполненная на гибкой

плате. Он покрывает любой изгиб тела. Место ношения можно выбрать максимально удобное для человека. Таким образом, он может использоваться в движении в повседневной жизни, открывая новые возможности в борьбе с сердечно-сосудистыми заболеваниями. ЭКГ пластырь (рис. 2) имеет коммерческий процессор, позволяющий локальную цифровую обработку сигналов, 2,4ГГц радиоканал и миниатюрный перезаряжаемый литий-ионный аккумулятор.

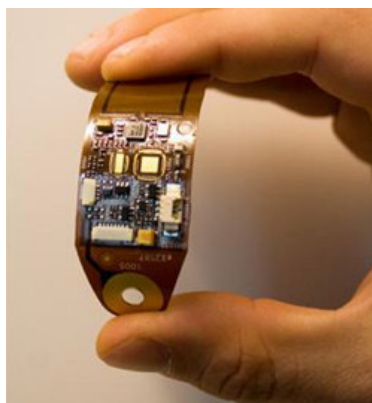


Рис. 2. ЭКГ пластырь

Холст Центр, Голландия, разработал миниатюрную портативную систему, которая позволяет следить за пульсом и снимать ЭКГ в повседневных условиях. Отличительными особенностями этой системы являются низкое энергопотребление и простота в использовании.

Датчики выполнены на гибких платах и объединены в одну цепь. Они прикрепляются к груди (рис. 3). ЭКГ снимается в двух проекциях. Данные с датчиков передаются через блютуз на смартфон пользователя, на который предварительно установлено специальное ПО. ЭКГ можно как просто наблюдать в реальном времени, так и сохранить.



Рис. 3. Портативная ЭКГ система

Все эти устройства нацелены именно на быструю диагностику работы сердца человека, но их стоимость достаточно высока. Поэтому, в компании ООО «Потенциал», молодыми учеными совместно с НИИ Кардиологии, разработано устройство для быстрой регистрации ЭКГ и специализированный медицинский сервис. Основным преимуществом «ЭКГ-экспресс» является наличие встроенных емкостных сенсоров. Для регистрации ЭКГ не требуется специальной подготовки участков тела, не нужно думать, куда правильно прикрепить электроды, — достаточно просто приложить прибор к грудной клетке и нажать кнопку, для записи ЭКГ. После регистрации электрокардиограммы, на экране прибора появляется функция отправки данных врачу [2]. Пациенту достаточно нажать на кнопку «отправить», и

данные с результатами его ЭКГ поступят врачу через специальный интернет-сервис.



Рис. 4. ЭКГ-экспресс

Для тестирования корректности регистрации сигнала с помощью емкостных сенсоров, были проведены исследования. Проводилась одновременная регистрация сигнал ЭКГ с использованием емкостных сенсоров и стандартных хлорсеребряных электродов. Апробация результатов проводилась с участием врачей - кардиологов, которые дали положительную характеристику качеству регистрируемого сигнала. Емкостные электроды точно описывают сигнал [3].

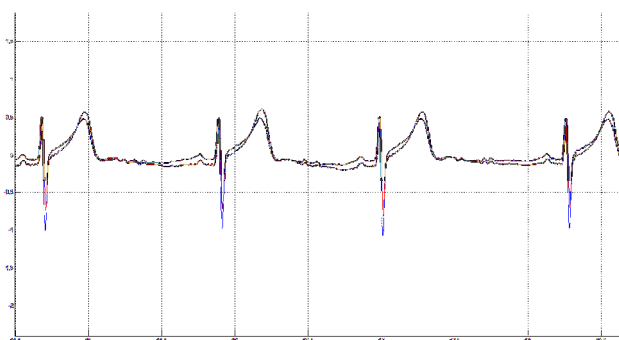


Рис. 5. Результаты сравнения емкостных сенсоров и хлорсеребряных электродов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения, Основные причины смерти, [Электронный ресурс] – URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/index2.html>, режим доступа – свободный (дата обращения 26.02.2017)
2. Бояхчян А.А., Уваров А.А., Оверчук К.В. Портативный прибор диагностики сердечно-сосудистых заболеваний «ЭКГ-Экспресс». Всероссийская научная конференция молодых ученых «Наука. Технологии. Инновации» - НТИ 2016.
3. Uvarov A., Lezhnina I., Overchuk K., Starchak A. Fast ECG recording and device for its implementation. International Conference on Mechanical Engineering, Automation and Control Systems, MEACS 2014.

**ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МОНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В
ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО**

И.В. Дерюшева, М.М. Цыганов, Е.О. Родионов

Научный руководитель: к.б.н. М.М. Цыганов

Научно-исследовательский институт онкологии,

Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,

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

E-mail: Irkin_097@mail.ru

**PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF MONORESISTANCE GENE EXPRESSION IN THE
TUMORS OF PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER**

I.V. Deryusheva, M.M. Tsyganov, E.O. Rodionov

Scientific Supervisor: Ph.D. M.M. Tsyganov

Cancer Research Institute,

Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences,

Russia, Tomsk, Kooperativny Street, 5, 634050

E-mail: Irkin_097@mail.ru

Abstract. *A significant role in the development of lung tumor resistance to drug therapy play so called mono resistance genes that determine resistance/sensitivity of tumor cells to distinct chemotherapeutic agents, they include BRCA1, RRM1, ERCC1, TOP1, TOP2a, TUBB3, TYMS, ABCC5 genes. It is shown that the use of these biomarkers as criteria to appoint the adequate postoperative chemotherapy is associated with the forecast. However in the course of neoadjuvant chemotherapy change the expression profile of these genes can occur, which can lead to misinterpretation of results. In this regard perspective is the development of new relevant prognostic factors, which take into account occurred molecular genetic alterations in lung tumors after preoperative therapy. We presented the results of the combined treatment of 52 patients with NSCLC IIA - IIIB stage, based on the analysis of chemotherapy resistance/sensitivity gene expression for appointment the suitable drugs. As a result, we have shown that expression of ERCC1, TUBB3, RRM1, ABCC5 and TYMS genes are the prognostic factor in the lung tumor after neoadjuvant chemotherapy.*

Актуальность. На сегодняшний день результаты хирургического лечения больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) II-III стадии остаются неудовлетворительными, а 5-летняя выживаемость составляет лишь 19–24% [1, 2]. Основываясь на этих данных, все чаще стала применяться системная, и в частности, неoadъювантная химиотерапия (НХТ). В недавних клинических исследованиях было установлено, что назначение НХТ в дополнение к хирургическому лечению позволяет значительно улучшить показатели общей и безрецидивной выживаемости пациентов, включая пациентов с III стадией [3]. Существенная роль в формировании резистентности/чувствительности опухолевых клеток к отдельным химиопрепаратам принадлежит генам монорезистентности. В настоящее время, при раке легкого охарактеризованы следующие гены: *BRCA1, RRM1, ERCC1, TOP1, TOP2a, TUBB3, TYMS, ABCC5* [4, 5]. Данные биомаркеры важны для использования в персонализации терапии при НМРЛ [6]. В этой связи актуальным является разработка новых прогностических факторов, которые учитывали бы

произшедшие изменения в опухоли легкого при проведении НХТ. Перспективными в этом отношении маркерами представляются гены монорезистентности, поскольку их экспрессия патофизиологически связана с ответом на тот или иной препарат посредством участия в метаболизме препаратов в клетках опухоли, трансмембранном транспорте, взаимодействии с мишенью, механизмах реализации апоптоза и репарации [6]. **Цель работы:** Оценка прогностической значимости уровня экспрессии генов монорезистентности у больных немелкоклеточным раком легкого после неoadъювантной химиотерапии.

Материал и методы. В исследование включены 52 больных НМРЛ IIА – IIIВ стадии, центральной или периферической локализации с морфологически верифицированным диагнозом, которые находились на лечении в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ. Все они получали 2 курса неoadъювантной химиотерапии по схеме винорелбин/карбоплатин. После НХТ пациентам проводилась операция в объеме пневмонэктомии или лобэктомии, затем адъювантная химиотерапия. В качестве исследуемого материала был использован операционный материал нормальной и опухолевой ткани легкого после НХТ. РНК выделяли из 52 парных образцов нормальной ткани легкого и опухоли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany). Уровень экспрессии генов *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TYMS*, *ABCC5*, *TUBB3*, *BRCA1*, *GSTP1* оценивали при помощи количественной обратной транскриптазной ПЦР в режиме реального времени относительно нормальной ткани легких. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0» (StatSoft Inc., США). Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, Для анализа безрецидивной выживаемости использовались кривые выживаемости, построенные по методу Каплана-Майера.

Результаты. В результате исследования было установлено, что экспрессия генов монорезистентности слабо коррелирует с основными клинико-морфологическими параметрами заболевания. В общей группе из 52 обследованных пациентов отдаленные метастазы и рецидивы развились у 16 (31%) больных в сроки 2–34 месяца от момента постановки диагноза. Однолетняя безрецидивная выживаемость составила 74,4%, 2-летняя – 60,6%, 3-летняя – 48%.

Таблица 1

Уровень экспрессии генов монорезистентности в опухоли после НХТ в зависимости от наличия гематогенных метастазов

Ген	Гематогенные метастазы и рецидивы		
	Наличие (n = 16)	Отсутствие (n = 36)	p-value
<i>RRM1</i>	0,65±0,11	0,52±0,07	0,2593
<i>ERCC1</i>	0,39±0,07	0,28±0,10	0,0068
<i>ABCC5</i>	1,02±0,18	1,43±0,40	0,5976
<i>GSTP1</i>	0,41±0,09	0,72±0,16	0,5856
<i>TOP1</i>	0,36±0,09	0,48±0,18	0,5156
<i>TOP2A</i>	1,78±0,53	2,30±0,75	0,4162
<i>TYMS</i>	0,46±0,13	0,91±0,24	0,5355
<i>TUBB3</i>	1,52±0,62	3,53±0,83	0,0218
<i>BRCA</i>	0,29±0,13	0,58±0,23	0,5541

В группе пациентов с наличием гематогенных метастазов и рецидивов уровень экспрессии *ERCC1* статистически значимо выше, по сравнению с группой без метастазов и рецидивов. Противоположный результат показан для гена *TUBB3*, низкий уровень его экспрессии связан с метастазированием (Таблица

1). С использованием метода Каплана-Майера было показано, что при полном отсутствии в опухоли легкого после НХТ экспрессии гена *ERCC1* безрецидивная выживаемость составила 95% против 42% у пациентов при наличии любого уровня экспрессии данного гена больше 0. Подобный результат был получен нами для гена *RRM1*, являющегося маркером чувствительности к гемцитабину [6]. Низкий уровень экспрессии (менее 0,5) сопряжен с высокими показателями выживаемости, тогда как высокий уровень является маркером плохого прогноза. Как оказалось, экспрессия двух других маркеров чувствительности к гемцитабину *TYMS* и *ABCC5* [6] не связана с прогнозом заболевания. Тем не менее, с показателями безрецидивной выживаемости был сопряжен паттерн экспрессии трех генов, определяющих чувствительность к гемцитабину: *RRM1*, *ABCC5* и *TYMS* (группа RAT). Было установлено, что при сочетании повышенной экспрессии (более 0,5) любых двух или всех генов группы RAT, показатели безрецидивной выживаемости составили 22%. Полученный результат свидетельствует о целесообразности оценки экспрессии нескольких маркеров. Также было показано, что отсутствие экспрессии гена *ERCC1* является независимым от экспрессии других генов прогностическим фактором. При нулевом уровне *ERCC1* в опухоли легкого независимо от высокого ($RAT > 0,5$) или низкого ($RAT < 0,5$) уровня генов *RRM1*, *ABCC5* и *TYMS* отмечается высокая безрецидивная выживаемость (100% и 92%, соответственно), метастазы были отмечены только у 1 из 12 больных. В то же время в группе пациентов с наличием повышенной экспрессии генов *RRM1*, *ABCC5*, *TYMS* и *ERCC1* метастазы наблюдались у 12 из 20 больных (60%).

Выводы. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о прогностической значимости экспрессии генов монорезистентности: *ERCC1*, *TUBB3*, *RRM1*, *ABCC5* и *TYMS* в опухоли легкого после НХТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трахтенберг А.Х. и Колбанов К.И. Рак легкого // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. - 2008. - №4. - С.3-9.
2. Goldstraw, P., Crowley, J., Chansky, K., Giroux, D.J., Groome, P.A., Rami-Porta, R., Postmus, P.E., Rusch, V., Sobin, L. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. Journal of Thoracic Oncology. no. 2, pp. 706-714.
3. Song, W.A., Zhou, N.K., Wang, W., Chu, X.Y., Liang, C.Y., Tian, X.D., Guo, J.T., Liu, X., Liu, Y., Dai, W.M. (2010). Survival benefit of neoadjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: an updated meta-analysis of 13 randomized control trials. Journal of Thoracic Oncology. no. 5, pp. 510-516.
4. Shatokhina, S.N., Zakharova, N.M., Dedova, M.G., Sambulov, V.I., Shabalin, V.N. (2013). Morphological marker of tumor progression in laryngeal cancer. Voprosy onkologii. no. 59, pp. 66-70.
5. Wei, C.H., Gorgan, T.R., Elashoff, D.A., Hines, O.J., Farrell, J.J., Donahue, T.R. (2013). A meta-analysis of gemcitabine biomarkers in patients with pancreato-biliary cancers. Pancreas. no 42, pp. 1-16.
6. Цыганов М.М., Родионов Е.О., Миллер С.В., Литвяков Н.В. Обоснование использования экспрессионных маркеров для персонализации химиотерапии рака легкого // Антибиотики и химиотерапия. - 2014. - Т. 60(9-10). - С. 38-45.

**ЭКСПРЕССИЯ АНТИ-АПОПТОЗНОГО БЕЛКА Bcl-xL В ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ
ГИППОКАМПА ПРИ ИХ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ**

У.С. Дрозд

Научный руководитель: к.б.н. Д.А. Ланшаков

Федеральный Исследовательский Центр Институт Цитологии и Генетики СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10, 630090

Новосибирский государственный университет,

Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2, 630090

E-mail: drozdnsu@gmail.com

**EXPRESSION OF ANTIAPOPTOTIC PROTEIN Bcl-xL IN OPTOGENETICALLY STIMULATED
HIPPOCAMPAL GLUTAMATERGIC NEURONS**

U.S. Drozd

Scientific supervisor: PhD D.A. Lanshakov

The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Russia, Novosibirsk, Lavrentiev av.,

10, 630090

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

E-mail: drozdnsu@gmail.com

Abstract. *The anti-apoptotic protein Bcl-xl takes part in processes of neuroplasticity such as synaptogenesis and release of neurotransmitters. In this study dependence of Bcl-xL expression on neuron activity was analyzed by in vivo optogenetic activating of the hippocampal glutamatergic neurons. The immunohistochemically determined level of protein Bcl-xL increased in photosensitive neurons as well as the level of the early response protein c-Fos that prove their activating by light. The activity-dependent expression of Bcl-xL support its role in neuroplasticity.*

Введение. Способность нервной системы реагировать на изменения во внутренней и внешней среде путем изменения своих морфологических и функциональных параметров лежит в основе важнейших нейронных функций, обуславливающих поведенческие реакции, память и адаптацию в физиологических и патологических условиях [1]. Это свойство, нейропластичность, проявляется в зависимости от активности нейронов на многих уровнях: от молекулярного, в виде изменений плотности рецепторных белков в синаптических мембранах и процессов выделения нейромедиаторов, до реконструкции и формирования новых отростков, шипиков и синапсов нервных клеток [2]. Обнаружено, что анти-апоптозный белок Bcl-xL необходим для некоторых из этих процессов. Кроме своей основной функции – защиты клеток от программируемой клеточной гибели, данный белок принимает участие в регуляции энергетики в синапсах, что модулирует процессы, происходящие в них [3], предотвращает развитие длительной терминальной депрессии, а также увеличивает число, размер и активность синапсов [4]. Кроме того, выявлена связь между повышенной экспрессией этого белка и психоэмоциональной и нейрохимической устойчивостью в условиях кратковременного стресса [5]. Регуляция экспрессии этого белка осуществляется многими стимулами, связанными с анти-апоптозными функциями [6], поэтому,

чтобы оценить влияние разрядной активности нейронов на уровень экспрессии в них Bcl-xL, мы напрямую активировали нейроны методом оптогенетики. Данный подход позволяет избирательно управлять активностью нейронов путем внедрения в мембрану нейронов светочувствительных ионных каналов, способных менять мембранный потенциал в ответ на стимуляцию светом [7].

Методы и материалы. На основе плазмид, полученных от фирмы Addgen (США), созданных группой К. Дейссерот, были собраны аденоассоциированные вирусные векторы (AVV) смешанного 1-2-го серотипа pAAV-CAMKIIa-ChR2H134-YFP, содержащие последовательность светочувствительного каналородопсина (ChR2H134) и флюоресцентного белка (YFP) под промотором CAMKIIa для глутаматергических нейронов. В качестве контрольного вектора использовали AAV-CAMKIIa-EGFP, содержащий зеленый флюоресцентный белок под регуляцией того же промотора. 3-дневным крысам линии Wistar вирусные вектора вводили в боковые желудочки головного мозга в количестве 5 μ l, титр 10^{11} под холодным наркозом в стереотаксическом приборе. Через 3 недели после введения векторов исследовали влияние оптогенетической стимуляции на экспрессию в нейронах белка Bcl-xL, а также белка раннего ответа c-Fos. Для этого животных наркотизировали уретаном, в стереотаксической раме помещали в гиппокамп оптоволокно и проводили стимуляцию синим светом (480 нм) в течение 5 минут. Через 30 минут после стимуляции проводили транскраниальную перфузию натрий-фосфатным буфером, содержащим 4% параформальдегид. Извлеченный мозг постфиксировали 4 часа в 4% параформальдегиде и делали срезы толщиной 300 мкм на вибраторе.

Выявление белков Bcl-xL и c-Fos проводили непрямым иммуногистохимическим методом согласно общепринятой методике. Полученные препараты фотографировали при помощи конфокального микроскопа, для анализа изображений использовали программу ZEN («Carl Zeiss», Германия). При этом подсчитывалось нормированное на 1 мм² общее количество Bcl-xL-позитивных или c-Fos-позитивных клеток, а также количество клеток, экспрессирующих одновременно c-fos или Bcl-xL и флюоресцентные белки: ChR2H134-YFP в подопытной группе и EGFP в контрольной. Различия между контрольной и подопытной группами оценивали по *t*-критерию Стьюдента и считали достоверным при $p < 0,05$.

Результаты. Через 3 недели после введения в мозг неонатальных крыс AAV-векторов в CA1 поле гиппокампа наблюдалась активная экспрессия флюоресцентных белков: ChR2H134-YFP и EGFP в опытной и контрольной группах соответственно.

Иммуногистохимическое выявление белка Bcl-xL показало, что данный белок после фотостимуляции усиленно экспрессируется в поле CA1 гиппокампа у животных подопытной группы, нейроны которой экспрессировали каналородопсин (ChR2-YFP) и были чувствительны к свету, по сравнению с контрольной группой животных, нейроны которых к свету чувствительны не были и экспрессировали EGFP (Рис. 1, А). На препаратах опытной группы было обнаружено большее число совместно экспрессирующих Bcl-xL и флюоресцентный белок нейронов, чем в контрольной группе ($p < 0,001$), а так же большее общее количество Bcl-xL-позитивных клеток ($p < 0,001$) (Рис. 1, Б).

Экспрессия гена c-fos в нейронах коррелирует с их спонтанной разрядной активностью. Иммуногистохимическое окрашивание белка раннего ответа c-Fos выявляло клетки которые были активны в процессе фотостимуляции [8]. У подопытной группы число клеток, совместно экспрессирующих c-Fos и флюоресцентный белок было значительно больше, чем у контрольной группы ($p < 0,0001$), как и общее число c-Fos-позитивных клеток ($p < 0,03$).

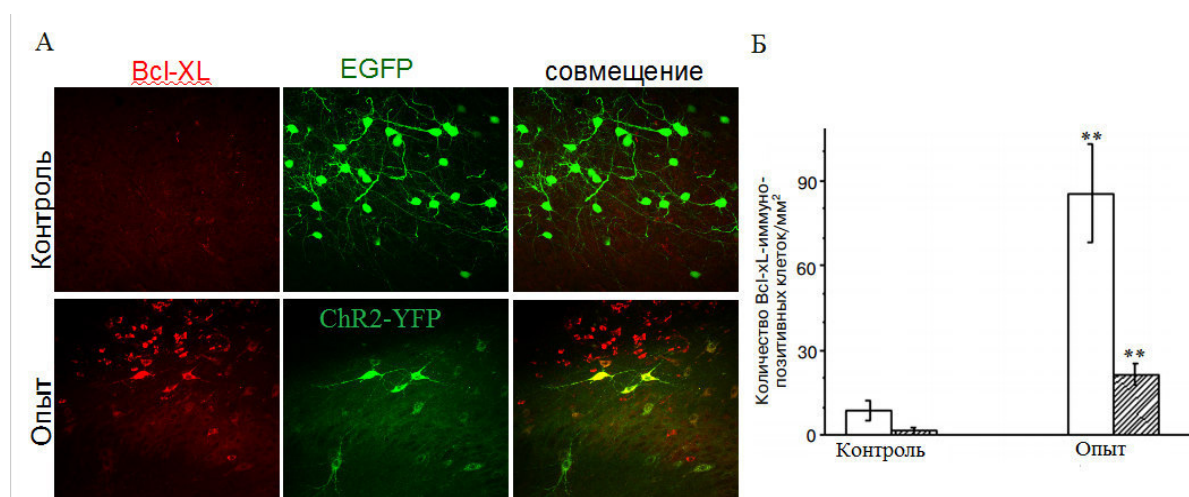


Рис. 1. А) Экспрессия белка Bcl-xL и флуоресцентных белков в нейронах поля CA1 гиппокампа. Б) Общее число Bcl-xL-позитивных клеток (белые столбцы) и клеток, экспрессирующих Bcl-xL совместно с флуоресцентным белком (заштрихованные столбцы) в контрольной и опытной группе. ** $p < 0,001$

Закключение. В совокупности полученные результаты говорят о том, что в светочувствительных нейронах после оптогенетической активации значительно повышается уровень анти-апоптозного белка Bcl-xL. Зависимость экспрессии данного белка в глутаматергических нейронах поля CA1 гиппокампа от их разрядной активности обнаружена впервые.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-15-0011

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, no. 6(6), pp. 463–475
2. Nudo, R. J. (2006) Plasticity. *NeuroRX*, no. 3(4), pp. 420–427
3. Jonas, E. (2006) BCL-xL Regulates Synaptic Plasticity. *Molecular Interventions*, no. 6(4), pp. 208–222
4. Li, H., Alavian K. N, Lazrove E., Mehta N., Jones A., Zhang P., & Guo J. (2013) A Bcl-xL–Drp1 complex regulates synaptic vesicle membrane dynamics during endocytosis. *Nature Cell Biology*, no 15(7), pp. 773–785
5. Shishkina, G. T., Kalinina T. S., Berezova I. V., Bulygina V. V., & Dygalo N. N. (2010) Resistance to the development of stress-induced behavioral despair in the forced swim test associated with elevated hippocampal Bcl-xl expression. *Behavioural Brain Research*, no. 213(2), pp. 218–224
6. Formentini L., Pereira M. P., Sánchez-Cenizo L., Santacatterina F., Lucas J. J., Navarro C., Martínez-Serrano A., & Cuezva, J. M. (2014) In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *The EMBO journal*, no. 33(7), pp. 762–78
7. Deisseroth, K. (2011) Optogenetics. *Nature Methods*, no. 8(1), pp. 26–29
8. Ланшаков Д. А., Дрозд У. С., Дыгало Н. Н. Оптогенетическая активация нейрона повышает в нем уровень антиапоптозного белка Bcl-xL // *Биохимия*. — 2017. — Т. 82. — Вып. 3. — с. 481.

**РОЛЬ РЕЦЕПТОРА ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА БЕТА I ТИПА В
ПРОГРЕССИИ ЛЮМИНАЛЬНОГО ПОДТИПА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Т.А. Дронова

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

НИИ Онкологии, Томский НИМЦ,

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

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

E-mail: tanyadronova@mail.ru

**ROLE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR RECEPTOR BETA I TYPE IN THE
PROGRESSION OF THE LUMINAL BREAST CANCER SUBTYPE**

T.A. Dronova

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

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,

Russia, Tomsk, Kooperativny Street, 5, 634050

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

E-mail: tanyadronova@mail.ru

Abstract. *Identification of additional biomarkers that are able to predict prognosis and treatment response may be very useful to distinguish patients who will benefit from tamoxifen treatment. The aim of the study was to examine the relationship between the protein and receptor gene expression of transforming growth factor β type I (TGF- β RI) and its polymorphism with progression of luminal breast cancer patients treated by adjuvant tamoxifen. Our data suggest that TGF- β RI protein expression level can be a potential molecular marker of tamoxifen resistance in the luminal breast cancer patients.*

Актуальность. На сегодняшний день большая часть больных раком молочной железы (РМЖ) имеет рецептор-позитивные люминальные опухоли, которые характеризуются высокими показателями чувствительности к гормональной терапии, а также благоприятным клиническим течением [1]. Несмотря на успехи лечения, у 10-30% больных возникает прогрессирование данного заболевания [2,3]. Формирование резистентности к гормональной терапии у больных люминальным РМЖ может быть обусловлено перекрестным взаимодействием рецепторов эстрогенов с сигнальными путями, которые реализуются через различные рецепторы факторов роста, одним из которых является рецептор трансформирующего фактора роста β I типа (TGF- β RI). Роль TGF- β RI в сопоставлении с эффективностью гормональной терапии у больных РМЖ в настоящее время недостаточно изучена. Следует отметить, что на сегодняшний день литературные данные об экспрессии гена *TGF- β RI*, его белкового продукта, а также полиморфизма *Int7G24(rs334354)* при РМЖ немногочисленны. Большая часть исследований проводится в общих группах больных без учета молекулярного подтипа опухоли [4, 5]. Данное исследование позволит оценить вклад TGF- β RI в механизмы формирования резистентности к гормонотерапии у больных люминальным РМЖ и определить его прогностическую значимость.

Цель работы: исследовать взаимосвязь белковой и генной экспрессии рецептора трансформирующего фактора роста β I типа и полиморфных вариантов его гена с прогнозом и эффективностью адъювантной гормональной терапии у больных люминальным раком молочной железы.

Материалы и методы. В исследование включены 105 пациенток с впервые выявленным операбельным раком молочной железы ($T_{1-4}N_{0-3}M_0$). У всех больных диагноз был подтвержден морфологически. Пациентки получали комбинированное лечение в объеме оперативного вмешательства, лучевой- и химиотерапии по показаниям. Обязательным компонентом адъювантного лечения для всех больных явился прием тамоксифена в течение 5 лет в стандартной дозировке (20 мг/сутки). Неоадъювантное лечение не проводилось. Для определения люминального подтипа рака молочной железы использована классическая панель из иммуногистохимических маркеров: ER, PR, HER2 и Ki-67. Возраст пациенток варьировал от 30 до 79 лет, средний – $54,5 \pm 0,9$ лет. В зависимости от отдаленных результатов лечения были сформированы две исследуемые группы: пациентки, имевшие прогрессирование заболевания на фоне приема тамоксифена составили тамоксифен-резистентную группу (ТР=39), больные без признаков прогрессирования – тамоксифен-чувствительную группу (ТЧ=53). Материалом для исследования служили образцы опухолевой и прилежащей нормальной ткани. Для изучения уровня экспрессии гена *TGF- β RI* была выделена тотальная РНК с помощью набора RNeasy Plus mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Германия). ДНК из опухолевых образцов была выделена путем депарафинизации срезов с помощью наборов QIaamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Германия). Уровень экспрессии гена *TGF- β RI* оценивали при помощи количественной обратной-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR). Анализ полиморфизма гена *TGF- β RI*(rs334354) был проведен с помощью метода ПЦР в режиме реального времени. Уровень белковой экспрессии TGF- β R1 изучен иммуногистохимическим методом. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы “STATISTICA 7.0”. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий согласия χ^2 . Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$.

Результаты. В результате исследования установлено, что уровень экспрессии гена *TGF- β RI* значимо выше у больных люминальным А РМЖ ($7,07 \pm 2,99$) по сравнению с люминальным В подтипом ($1,81 \pm 0,55$; $p = 0,050$). При сопоставлении уровня экспрессии белка TGF- β R1 в опухолевой ткани больных люминальным А и В подтипами не было выявлено статистически значимых различий. Частота встречаемости как мутантного генотипа *Int7G24AA*, так и аллеля *Int7G24A* гена *TGF- β RI* (rs334354) была значимо выше среди больных с люминальными А опухолями по отношению к пациенткам с люминальным В подтипом ($p = 0,019$ и $p = 0,007$, соответственно). Анализ взаимосвязи уровня генной экспрессии *TGF- β RI* с эффективностью адъювантной терапии тамоксифеном не подтвердил статистически значимых различий как в общей группе больных, так и в группах пациенток люминальным А и В подтипом опухоли. Следует отметить, что группа ТЧ пациенток как с люминальным А, так и люминальным В РМЖ, характеризовалась более высоким уровнем экспрессии мРНК *TGF- β RI* по сравнению с ТР группой соответственно люминального А и В РМЖ, однако достоверных различий достигнуто не было ($p = 0,637$ и $p = 0,542$, соответственно). Статистически значимые результаты были получены при изучении уровня экспрессии белковых продуктов гена *TGF- β RI*. Выявлено, что позитивная экспрессия TGF- β R1 чаще наблюдалась среди пациенток ТЧ группы, по

сравнению с ТР группой больных ($p = 0,043$). При разделении группы больных по молекулярному подтипу выявлена тенденция к взаимосвязи высокого уровня экспрессии белка TGF- β RI с чувствительностью к терапии тамоксифеном только среди больных люминальным В раком молочной железы ($p = 0,090$). Анализ частот встречаемости аллельных вариантов гена *TGF- β RI* не выявил значимых ассоциаций с эффективностью проводимой гормональной терапии, как в общей группе пациенток, так и в зависимости от подтипа опухоли.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что прогностически благоприятный люминальный А подтип РМЖ характеризуется более высоким уровнем экспрессии мРНК *TGF- β RI* и высокой частотой встречаемости мутантных генотипов и аллелей гена *TGF- β RI* (rs334354) по сравнению с люминальным В РМЖ. Уровень белковой экспрессии TGF- β RI является одним из факторов, сопряженных с эффективностью лечения тамоксифеном у пациенток с люминальным типом рака молочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МД-9084.2016.7 (молекулярно-генетические исследования) и гранта РФФИ № 16-54-76015 ЭРА_а (набор биологических образцов и клинические данные пациентов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sihto, H., Lundin, J., Lundin, M., Lehtimäki, T., Ristimäki, A., Holli, K., Sailas, L., Kataja, V., Turpeenniemi-Hujanen, T., Isola, J., Heikkilä, P., Joensuu, H. (2011) Breast cancer biological subtypes and protein expression predict for the preferential distant metastasis sites: a nationwide cohort study. *Breast Cancer Research*, no. 5, pp. 1-11.
2. Ring, A., Dowsett, M. (2004) Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-Related Cancer*, no. 4, pp. 643-658.
3. Band, A.M., Laiho, M. (2011) Crosstalk of TGF- β and estrogen receptor signaling in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, no. 2, pp. 109-15.
4. Chen, C., Zhao, K.N., Masci, P.P., Lakhani, S.R., Antonsson, A., Simpson, P.T., Vitetta, L. (2015) TGF β isoforms and receptors mRNA expression in breast tumours: prognostic value and clinical implications. *BMC Cancer*, no. 15, pp. 1-12.
5. Song, B., Margolin, S., Skoglund, J., Zhou, X., Rantala, J., Picelli, S., Werelius, B., Lindblom, A. (2007) TGFBR1(*)6A and Int7G24A variants of transforming growth factor beta receptor 1 in Swedish familial and sporadic breast cancer. *Br J Cancer*, no. 5, pp. 1175-9.

**ТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНА ОРНИТИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В
*ARABIDOPSIS THALIANA***

А.А. Егорова

Научный руководитель: к.б.н. С.В. Герасимова

Новосибирский государственный университет

Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090

E-mail: egorova@bionet.nsc.ru

THE TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF OAT GENE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

A.A. Egorova

Scientific Supervisor: S.V. Gerasimova

Novosibirsk State University

Russia, Novosibirsk, Pirogova str., 2, 630090

E-mail: egorova@bionet.nsc.ru

Abstract. *Ornithine aminotransferase (OAT) enzyme catalyzes the transfer of the delta-amino group from L-ornithine to oxo-glutarate. In plants, this reaction biochemically connects urea cycle, proline cycle, and polyamines biosynthesis pathway. OAT activity is usually associated with biotic and abiotic stress response and nitrogen metabolism. Our previous results show that OAT promoter activity is associated with growth zones. The aim of present study is to investigate the transcriptional regulation of the plant OAT gene in Arabidopsis thaliana.*

The transcriptional regulation of OAT gene was investigated on A. thaliana plants with reporter gene system containing E.coli β -glucuronidase gene (GUS) under A. thaliana OAT gene promoter control. Seedlings were treated with different growth regulators; the promoter activity was analyzed histochemically. The reporter protein expression was observed in response to different forms of auxin (IAA, NAA, and 2,4D), cytokine (6-BAP), and ethylene precursor (ACC). These results allow us to suggest the role of OAT gene in plant cell proliferation and expansion. The results show that OAT gene might be involved in plant growing processes.

Введение. Одним из важнейших признаков организмов является их способность к росту. Рост растения осуществляется за счет функционирования меристем. В меристемах происходят активные метаболические процессы, в частности азотного метаболизма. Фермент орнитинаминотрансфераза (ОАТ) катализирует трансаминирование орнитина и альфа-кетоглутарата. Этот фермент связывает разные метаболические циклы: цикл мочевины, цикл накопления и деградации пролина, связан с биосинтезом полиаминов, алкалоидов, участвует в азотном метаболизме растений. Показана его связь с различными биотическими и абиотическими стрессами. Но все еще имеются противоречивые сведения о функциях этого гена. В нашей лаборатории была показана активность этого гена в меристемах и повышенная способность к росту трансформантов с повышенной экспрессией гена ОАТ в условиях солевого стресса [1, 2].

Цель данной работы - изучение транскрипционной регуляции гена ОАТ *Arabidopsis thaliana*. Исследование проводится в трансгенных растениях *A. thaliana*, несущих репортерную конструкцию, позволяющую визуализировать активность промотора гена ОАТ.

Материалы и методы. Изучение активности промотора гена ОАТ проводилось на трансгенных растениях *Arabidopsis thaliana* поколения Т3, несущих репортерный ген глюкоенидазы *E. coli* под контролем промотора гена ОАТ *A. thaliana* [2]. Недельные проростки, выращенные на среде MS 1/2 [3] с добавлением канамицина пересаживались на среду MS 1/2 с добавлением разнообразных индукторов:

α -нафтилуксусная кислота (НУК), индолил-3-уксусная кислота (ИУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D), 6-бензиламинопурин (БАП), кинетин, транс-зеатин, гибберелловая кислота (ГА3), аминокислота пропан-1-карбоксилат (АЦК), абсцизовая кислота (АБК), метилжасмонат. Определение экспрессии репортерного гена β -глюкоенидазы проводилось гистохимическим методом с использованием модифицированного субстрата X-Gluc (Fermentas).

Результаты. Было показано, что транскрипционная активность промотора гена ОАТ индуцируется в ответ на некоторые из растительных гормонов, участвующие в регуляции роста и развития. Сильнее всего видна реакция на один из синтетических ауксинов — 2,4-D, так же есть реакция на все виды ауксинов – НУК, ИУК, 2,4-D, использовавшиеся в работе. Из использованных цитокининов, промотор активировал только БАП, также была реакция на АЦК, предшественник этилена (Таблица 1, Рисунок 1).

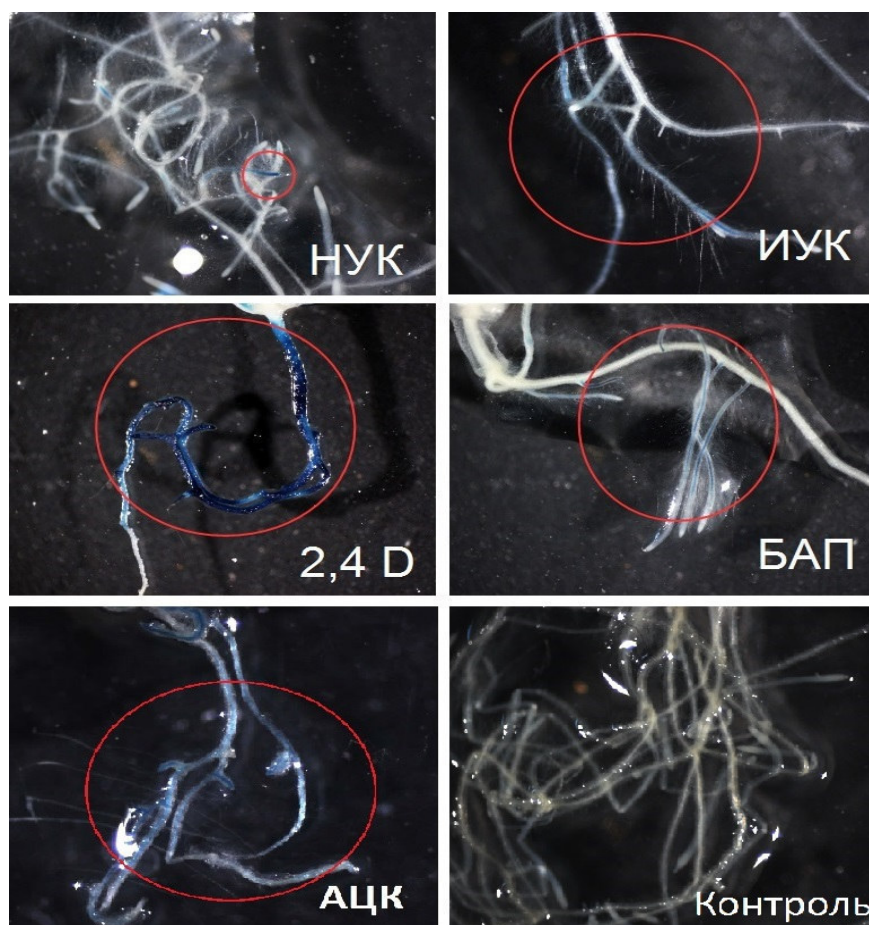


Рисунок 1. Экспрессия гена-репортера в ответ на некоторые из индукторов

Таблица 1.

Индукция промотора гена OAT A. thaliana

Индуктор	Концентрация вещества	Локализация активности промотора	Продолжительность воздействия, дни
НУК	1мг/л	Кончики корней	6
ИУК	2мг/л	Отдельные корни	6
2,4D	0,5 мг/л	Вся корневая система.	6
БАП	1мг/л	Боковые корни	6
Кинетин	10μМ и 100μМ	Нет индукции	
Транс-зеатин	100μМ	Нет индукции	
Гибберелловая кислота	10μМ	Нет индукции	
АЦК	50μМ	По длине корней	4
АБК	100μМ	Нет индукции	
Метилжасмонат	1mM	Нет индукции	

Заключение. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что ген OAT регулируется стимулами, связанными с ростовыми процессами растений. Реакция на разные виды ауксинов позволяет предположить связь функций гена OAT с растяжением клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Герасимова С.В. и др. Трансформанты табака, экспрессирующие кДНК гена орнитинаминотрансферазы *Medicago truncatula* // Генетика. – 2010. – Т. 46. – № 7. – С. 1000–1003.
2. Герасимова С.В. и др. Анализ транскрипционной активности промотора гена дельта орнитинаминотрансферазы *Arabidopsis thaliana* // Генетика. – 2011. – Т.47. – №5. – С. 707–710.
3. Murashige T., Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*, vol. 15, no. 3, pp. 473–497.

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

И.Б. Жамангарина, М.Р. Патышева, А.А. Андреева

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

Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

E-mail: inzhu_03.01@mail.ru

**PHENOTYPIC PROFILE OF INFLAMMATORY MONOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF
BREAST CANCER PATIENTS**

I.B. Zhamangarinova, M.R. Patysheva, A.A. Andreeva

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. In this work monocytes expressing receptors were determined by flow cytometry. Significant differences of variables received from patient and healthy donors were detected.*

Введение. Моноциты, как эффекторы неспецифического иммунитета, представляют собой перспективную мишень для диагностики и терапевтических манипуляций при заболеваниях, сопровождающихся воспалением. В данной работе были определены моноциты, экспрессирующие рецепторы методом проточной цитофлуориметрии. Были выявлены достоверные отличия исследуемых показателей в сравнении со здоровыми добровольцами. В настоящее время воспаление признается одним из ведущих факторов этиологии и патогенеза РМЖ [1].

В ходе различных стадий патогенеза злокачественных новообразований иммунная система ведёт себя по-разному: она может подавлять распространение опухоли, ингибируя или уничтожая раковые клетки, и способствовать опухолевой прогрессии путем селекции наиболее устойчивых опухолевых клонов и созданию таких условий микроокружения, которые были бы благоприятны для роста раковых клеток [2,]. Следовательно, оценивая функциональное состояние иммунной системы, можно определить риск прогрессирования и исход онкологического заболевания [3,4,]. Клетки моноцитарно-макрофагального происхождения являются одними из центральных эффекторов воспаления. М1 и М2 макрофаги играют важную роль в формировании иммунного ответа в ходе канцерогенеза, и такой процесс как поляризация определяет то, как отреагирует организм на опухоль: будет уничтожать её или способствовать росту. Известно, что М1-макрофаги проявляют свойства эффекторов острой фазы воспаления с выраженной цитотоксической функцией, в том числе, противоопухолевой. М2-макрофаги, активированные по альтернативному пути с участием IL-4 и IL-13, напротив, потенцируют опухолевый рост и способствуют опухолевой прогрессии [5]. Популяционная структура моноцитов ПК (периферическая кровь) определяется уровнем циркулирующих индукторов поляризации М1 и М2 -

интерферона- γ и интерлейкина-4 соответственно, а также чувствительностью к их воздействию, связанной с наличием соответствующих рецепторов.

Принцип метода проточной цитофлуориметрии основан на измерении и оценке флуоресценции и светорассеяния детекторами прибора при прохождении лазерного луча клеткой, находящейся в клеточной суспензии. Для того чтобы каждая клетка могла регистрироваться отдельно, создаётся разница давления в зонде между «обжимающей» образец жидкостью и образцом. Это приводит к тому, что клетки, находясь в ламинарном потоке жидкости, выстраиваются в цепочку друг за другом. В определенном месте клетки пересекают луч света, и происходит считывание информации. В данном случае прибор, помимо измерения основных параметров (размер, соотношение размеров ядра и цитоплазмы, неоднородность или гранулярность цитоплазмы), детектировал комплекс антиген-антитело-флуорофор и выводил полученную информацию на монитор компьютера [6].

Целью работы явилось сравнение M1 и M2 структуры моноцитов ПК и экспрессии ими рецепторов к интерферону- γ (ИФН- γ) и интерлейкину-4 (ИЛ-4) у больных раком молочной железы (РМЖ) в сравнении со здоровыми лицами.

Материалы и методы исследования: В исследование включено 10 пациенток с впервые диагностированным инвазивным РМЖ и 6 здоровых женщин. В периферической крови методом проточной цитофлуориметрии были определены M1 (CD68+), M2 (CD163+) моноциты, а также моноциты, экспрессирующие рецепторы к ИФН- γ (CD119+) и ИЛ-4 (CD124+).

Подготовка проб для анализа происходила в несколько этапов. В пробирку для цитометра со 100 мкл цельной венозной гепаринизированной крови добавляли моноклональные антитела (BD Pharmingen™, USA) для поверхностного окрашивания, как показано в табл. 1.

Таблица 1

Антитела для фенотипа моноцитов

Антитела \ № пробирки	1	2	3
	1	2	3
FITC Mouse Anti-Human CD68	2 мкл	2 мкл	2 мкл
PE Mouse Anti-Human CD163	5 мкл	–	–
PE Mouse Anti-Human CD119	–	2мкл	
PE Mouse Anti-Human CD124	–	-	5мкл

Так как для CD68 и CD163 используется один флуорофор – фикоэритрин (PE), то измерять эти антигены нужно было в двух отдельных пробирках. Необходимо заметить, что параллельно с «окрашенными» пробирками была одна «неокрашенная», то есть та, с которой происходили все те же манипуляции, что и с остальными двумя, кроме добавления моноклональных антител (табл. 1).

После добавления антител пробирки инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем проводилось лизирование эритроцитов путем добавления 900 мкл рабочего лизирующего раствора, который готовился из концентрированного BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, USA) добавлением дистиллированной воды из соотношения 1:10. После – повторная

инкубация в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут. По окончании инкубации проводилась отмывка: в пробирку вносили 2 мл раствора BD Cell Wash (BD Biosciences, USA), полученный раствор перемешивался, а затем центрифугировался в течение 5 минут при 3000 оборотах. После центрифугирования надосадок сливался, и проводилась повторная отмывка по той же схеме. Финальным этапом являлось добавление 450 мкл раствора FACSFlow (BD Biosciences, USA) в каждую из четырёх пробирок к полученному осадку. Затем происходило непосредственное измерение на проточном цитометре FACSCanto II (BD Biosciences, USA). Причём первой проходило измерение «неокрашенная» пробирка для последующей оценки образцов с флюорохромами.

Данные о соотношении субпопуляций моноцитов измерялись в процентном соотношении от всего пула моноцитов периферической крови и были получены с помощью программного обеспечения Diva (BD Biosciences, USA), а затем полученные цифры переводились в абсолютные значения.

Результаты. В проведенном исследовании содержание провоспалительных M1 (CD68⁺) моноцитов и моноцитов, экспрессирующих рецепторы к ИФН- γ – индуктору M1-поляризации, не имело статистически значимых различий у здоровых лиц и у больных РМЖ. Однако количество противовоспалительных M2 (CD163⁺) моноцитов и моноцитов, экспрессирующих рецептор к индуктору M2-поляризации ИЛ-4, в ПК у больных РМЖ было ниже в 22 и в 8 раза по сравнению с соответствующими показателями у здоровых лиц ($p < 0,05$).

Заключение. В отличие от здоровых лиц у больных РМЖ в ПК снижен уровень M2 моноцитов и моноцитов, чувствительных к действию M2-индуктора ИЛ-4.

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 TNF α and Chemokines. *Cancer Microenvironment*, no.5 (2), pp. 151-164.
2. Стахеева М. Н., Д. Эйдензон, Е. М., Слонимская и др. Взаимосвязь состояния иммунной системы как интегрированного целого с клиническим течением рака молочной железы // *Сибирский онкологический журнал*. – 2011. – № 2. – С. 11–19.
3. Whiteside, T. L. (2013) Immune responses to cancer: are they potential biomarkers of prognosis. *Frontiers in Oncology*, no. 3, pp. 1-8
4. Lippitz, B. E. (2013) Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *The Lancet Oncology*, no. 6, pp. 218–228.
5. Sica, A., Mantovani, A. (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*, no. 122(3), pp. 787-795.
6. Хайдуков, С.В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине // *Медицинская иммунология*. – 2007. – № 4-5. – С. 373–378.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ И АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИ ПОРАЖЕННЫХ СОСУДАХ

А.А. Зарубин, А.В. Марков

Научный руководитель: к.б.н. М.В. Голубенко

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Федерального государственного
бюджетного научного учреждения "Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук",

Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10, 634050

E-mail: a.a.zarubin@gmail.com

COMPARATIVE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA HETEROPLASMY IN LEUCOCYTES AND ATHEROSCLEROTIC LESIONS

A.A. Zarubin, A.V. Markov

Scientific Supervisor: M.V. Golubenko

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy
of Sciences, Russia, Tomsk, Nab. Ushaiki, 10, 634050

E-mail: a.a.zarubin@gmail.com

Abstract. Mitochondrial DNA (mtDNA) is exposed to reactive oxygen species in mitochondria, and oxidative stress is important factor in atherosclerosis development. Oxidative damage leads to somatic mtDNA mutations which can persist in cell in heteroplasmic state. The aim of the study was to analyze mtDNA heteroplasmy in carotid atherosclerotic lesions and leucocytes of patients with atherosclerosis ($n = 22$) and healthy individuals ($n = 14$). Heteroplasmy was estimated using massive parallel sequencing technology (MiSeq, Illumina). The results of the study show that mtDNA heteroplasmy is abundant phenomenon in both patients and controls (altogether 143 heteroplasmic positions at level $>1.5\%$). However, mean level of mutant molecules was low ($<10\%$). The highest frequency of somatic mutations was registered in noncoding regions, and the lowest frequency was in protein-coding genes. In some positions, recurrent mutations have been found. Among them, heteroplasmy in 16390 position was found only in atherosclerotic plaques, so it can be tissue-specific. In addition, we found heteroplasmy in position 166 in most samples, with mean level in patients higher than in controls.

Введение. Атеросклероз сосудов участвует в развитии большинства сердечно сосудистых заболеваний, которые вносят наибольший вклад в мировую смертность [1]. В патогенезе атеросклероза участвует множество факторов, но исследователи придают всё большее значение свободным радикалам и перекисному окислению липидов [2]. В свою очередь митохондрии, будучи “энергетической станцией клетки” и участвуя в окислительных процессах, являются источником свободных радикалов. При этом геном митохондрий (мтДНК) восприимчив к повреждающему воздействию, что приводит к появлению соматических мутаций. Возникающие мутации, в свою очередь, могут нарушать функции митохондрии (окислительное фосфорилирование, окисление жирных кислот), что может усугублять повреждающее

воздействие. В большинстве случаев соматические мутации мтДНК существуют в клетке в состоянии гетероплазмы.

Цель настоящего исследования заключалась в анализе гетероплазмы мтДНК у больных атеросклерозом сонных артерий и здоровых индивидов.

Материалы и методы. Для исследования были использованы парные образцы ДНК, полученные из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) и бляшек сонных артерий (САБ) у пациентов с атеросклерозом ($n = 22$), а также контрольные образцы ($n = 14$), полученные из лейкоцитов индивидов без признаков каротидного атеросклероза. Оценку гетероплазмы проводили путем массового параллельного секвенирования на приборе MiSeq (Illumina): митохондриальный геном амплифицировали в двух перекрывающихся фрагментах, ДНК-библиотеки готовили с помощью набора Nextera XT (Illumina). Полученные fastq файлы обрабатывали при помощи веб сервиса mtDNA-Server [3], после этого выходные данные дополнительно обрабатывали в статистической среде R. Образцы с низким покрытием были исключены из анализа. Значимым уровнем гетероплазмы считали уровень выше 1,5% и рассматривали только позиции, имеющие больше 1000 прочтений.

Результаты. Проведенный анализ выявил гетероплазмию в 143 позициях, расположенных в регионах мтДНК с различной функцией (табл. 1).

Таблица 1

Гетероплазмичные позиции, выявленные в исследованных образцах

Образец	Количество гетероплазмичных позиций в различных регионах					Среднее покрытие (число прочтений)
	Общее	Некодирующие участки	рРНК	тРНК	Белки	
САБ ($n = 19$)	51	33 (64,7%)	3 (5,9%)	1 (2%)	14 (27,5%)	5448
ЛПК, пациенты ($n = 16$)	40	26 (65%)	4 (10%)	0	10 (25%)	5064
ЛПК, контроль ($n = 12$)	52	27 (51,9%)	11 (21,2%)	1 (2%)	13 (25%)	6030

Из выявленных гетероплазмичных позиций, 20 были зарегистрированы только в атеросклеротических бляшках, 16 – только в крови пациентов и 30 – только у здоровых лиц. Также было обнаружено 6 гетероплазмий, которые встречались в парных образцах кровь-бляшка; значимых различий в уровне гетероплазмы между кровью и бляшкой по этим позициям не было выявлено (сравнение с использованием парного критерия Вилкоксона, $p = 0,7422$).

Четыре гетероплазмичные мутации встретились одновременно в 2 контрольных образцах, но не были зарегистрированы у пациентов. Более чем в двух образцах была обнаружена гетероплазмия 16390G>A, которая встречалась только в образцах атеросклеротических бляшек ($n=4$) со средним уровнем 2,26%, а также гетероплазмия 166C>T, представленная в 11 парных образцах крови и бляшки и в 9 контрольных образцах. Для гетероплазмы 166C>T было выявлено статистически значимое различие в уровне гетероплазмы между контрольными образцами (1,93%) и кровью пациентов (2,52%) с помощью критерия Вилкоксона, ($p = 0,02$), разницы в уровне гетероплазмы в крови (2,52%) и бляшке (2,41%) у пациентов не было выявлено ($p = 0,82$). Гетероплазмия 16390G>A была обнаружена другими

исследователями, главным образом в тканях тонкого кишечника, на уровне 2,3%; при этом в крови гетероплазмия в этой позиции отсутствовала (ткани сосудистой стенки в данной работе не были изучены) [4].

Более половины гетероплазмичных позиций было зарегистрировано в некодирующих участках мтДНК, занимающих всего 7% митохондриального генома, около 25% гетероплазмий было выявлено в белок-кодирующих генах (69% мтДНК). В генах транспортных и рибосомальных РНК (24% мтДНК) было найдено около 10% от общего числа гетероплазмичных позиций у больных и около 23% у здоровых (различия не значимы). Средний уровень гетероплазмии (доля мутантных молекул в общем пуле мтДНК) составил 5,3% у здоровых, 6,1% в атеросклеротических бляшках и 6,3% в крови пациентов. Только 7 (13,7%) позиций в образцах атеросклеротических бляшек, 6 (15%) – в крови пациентов и 6 (11,5%) в крови здоровых лиц имели уровень гетероплазмии более 10%. Полученные нами оценки в целом соответствуют литературным данным: например, в работе М. Li с соавторами средний уровень гетероплазмии в крови составил 7,23%, и в 17,3% случаев уровень мутантной мтДНК превышал 10% [4].

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования нами было установлено, что гетероплазмия мтДНК – распространенное явление как у пациентов с атеросклерозом, так и у здоровых. Однако средний уровень мутантных молекул невысок (менее 10%) и не достигает порогового значения, необходимого для фенотипического проявления мутаций. Наибольшая частота соматических мутаций характерна для некодирующих регионов мтДНК, а наименьшая – для генов, кодирующих белки. Гетероплазмия 16390 G>A была зарегистрирована только в атеросклеротических бляшках – таким образом, гетероплазмия в этой позиции может быть тканеспецифичной. Гетероплазмия в позиции 166C>T встречается во многих образцах – вероятно, этот сайт является «горячей точкой» мутагенеза в мтДНК. Средний уровень мутантного аллеля в позиции 166 у пациентов (2,5%) выше, чем у здоровых индивидов (1,9%).

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ №14-15-00305.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирный атлас профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и борьбы с ними: политика, стратегия и меры борьбы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44701/6/9789244564370_rus.pdf?ua=1. – ВОЗ, 2013. – 163 с.
2. Singh, R., Devi, S., & Gollen, R. (2015). Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: larger-than-life. Diabetes/metabolism research and reviews, no. 2, pp. 113-126.
3. Weissensteiner, H., Forer, L., Fuchsberger, C., Schöpf, B., Kloss-Brandstätter, A., Specht, G., ... & Schönherr, S. (2016). mtDNA-Server: next-generation sequencing data analysis of human mitochondrial DNA in the cloud. Nucleic Acids Research, no. 44(W1), pp. W64-69.
4. Li, M., Schröder, R., Ni, S., Madea, B., & Stoneking, M. (2015). Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. Proceedings of the National Academy of Sciences, no. 8, pp. 2491-2496

**СТАТУС ВПЧ И ЕГО ГЕНОМНАЯ ИНТЕГРАЦИЯ
ВЛИЯЕТ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РШМ**

М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов, И.В. Дерюшева

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

Томский национальный исследовательский медицинский центр

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

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

E-mail: imk1805@yandex.ru

**HPV STATUS AND ITS GENOMIC INTEGRATION AFFECT SURVIVAL OF PATIENTS WITH
CERVICAL CANCER**

M.K. Ibragimova, M.M. Tsyganov, I.V. Deryusheva

Scientific Supervisor: Ph.D., N.V. Litviakov

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

Tomsk, Kooperativny str. 5, 634050

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

E-mail: imk1805@yandex.ru

Abstract. *The study involved 140 patients with the stage I-IV cervical cancer (CC) 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. The prevalence of virus-positive cases among the patients with cervical cancer patients was 77.1%. 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 CC.*

Введение. В инфицированной клетке вирус папилломы человека (ВПЧ) может существовать в эписомальной форме (вне хромосом клетки) - считается доброкачественной, интегрированной (встроенной в геном клетки) - расценивается как злокачественная форма персистенции вируса и смешанной форме (наличие свободного и встроенного в ДНК клетки-хозяина вируса) [1]. Прогрессия от клеточных изменений, связанных с ВПЧ-инфекцией, до развития рака шейки матки (РШМ) занимает около 10-40 лет, но редко может развиваться и за 1-2 года, что, несомненно, доказывает важность своевременного мониторинга больных папилломавирусной инфекцией и проведения вирусологических исследований для выявления групп риска развития онкологической патологии [2]. **Целью** настоящей работы явилась оценка безрецидивной и общей выживаемости HPV- позитивных с учетом физического статуса ВПЧ 16 типа и ВПЧ-негативных больных первичным РШМ.

Материал и методы. В исследование было включено 140 пациенток в возрасте от 21 до 79 лет с первичным РШМ I-IVA стадий, проходивших обследование и лечение в Томском НИМЦ. Диагноз верифицирован гистологически, опухоли были охарактеризованы в соответствии с классификацией FIGO. Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки. Всем пациенткам было проведено выявление и генотипирование ДНК ВПЧ. Из всех обследованных была выделена группа пациенток с носительством ВПЧ (n=108), далее для пациенток с

ВПЧ 16 типа было также проведено определение физического статуса ДНК ВПЧ. Выявление, генотипирование ДНК ВПЧ и определение физического статуса ДНК ВПЧ 16 проводили методом ПЦР в режиме реального времени на приборе RotorGene 6000 («Corbett Research», Австралия) с использованием комплектов реагентов фирмы «Amplisens®» (Москва, Россия). Значение вирусной нагрузки рассчитывалось в геномных эквивалентах ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток, порог релевантного количества вируса принимался равным $3 \lg$ ДНК HPV/ 10^5 клеток в соскобе. Выявление области Е6 при отсутствии области Е1/Е2 интерпретировалось как интеграция ВПЧ в ДНК человека, выявление области Е6 при наличии области Е1/Е2 – как смешанная форма вируса, отсутствие области Е6 при наличии области Е1/Е2 – как эписомальная форма вируса. Оценку выживаемости проводили по методу Каплана-Майера.

Результаты и обсуждение. Из 108 ВПЧ+ больных РШМ ВПЧ 16 типа (монотип или в комбинации с другими типами) имели 87 больных (80,6%) у которых был изучен физический статус вирусной ДНК. Остальные пациентки имели другие типы вируса: 31 тип ВПЧ – 8 пациенток (7,4%), 33 тип ВПЧ – 6 пациенток (5,6%), 56 тип ВПЧ – 4 пациентки (3,7%), 45/52 типы ВПЧ – 3 пациентки (2,8%), 39/51/58/59 типы ВПЧ – по 2 пациентки (1,9%). Известно, что интеграция ВПЧ в клеточный геном признана одним из основных факторов развития тяжелых дисплазий и опухолевой трансформации эпителия шейки матки [3]. По результатам немногочисленных исследований интегрированная форма ДНК ВПЧ встречается в пределах 35% в зависимости от тяжести дисплазии, а эписомальная форма встречается реже – до 15% случаев [4]. 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, что не противоречит литературным данным.

Следующим шагом было изучение исхода заболевания в зависимости от физического статуса вируса. На рисунке 1 представлена безрецидивная и общая выживаемость больных РШМ в зависимости от физического статуса вируса для HPV16+ больных, а также для сравнения представлена группа ВПЧ-пациенток.

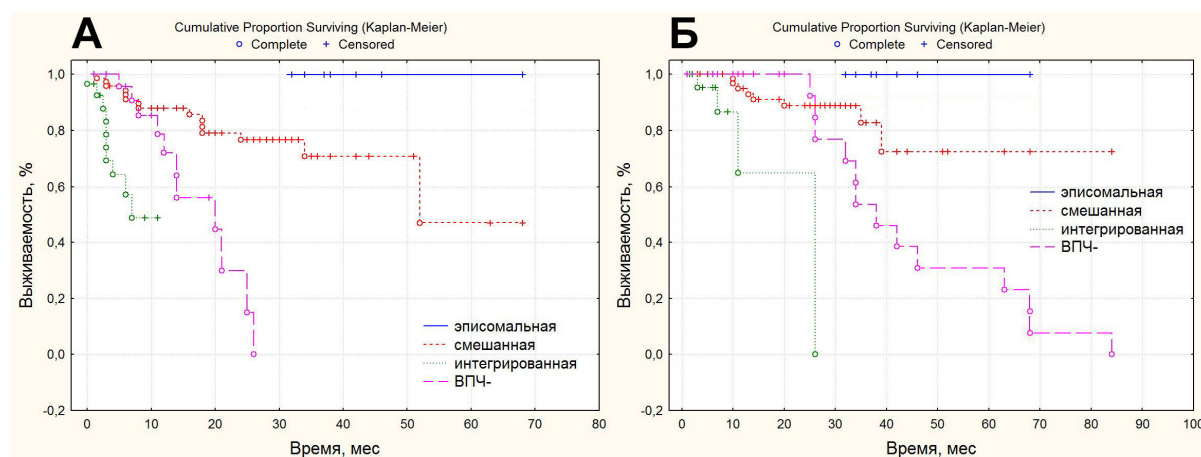


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных РШМ ($p = 0,0001$) (а) и общая выживаемость больных РШМ ($p = 0,0004$) (б)

Установлено, что распределение безрецидивной и общей выживаемости для всех четырех групп больных статистически значимо. У больных с эписомальной формой ВПЧ16 наблюдается 100% безрецидивная и общая выживаемость. Самый неблагоприятный исход отмечается у больных с интегрированной формой ВПЧ 16 типа. Т.о., в результате исследования установлена прогностическая значимость физического статуса ВПЧ 16 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 ВПЧ-пациенток и больных со смешанной формой вируса.

Заключение. В результате проведенного исследования, были получены данные о выживаемости больных РШМ в зависимости от физического статуса вируса (для ВПЧ+ больных) и больных ВПЧ-негативным раком. Было показано, что наилучший прогноз имеют HPV+ пациентки с эписомальной формой вируса, наихудший – ВПЧ+ 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jiang, M.R., Baseman, J.G., Koutsky, L.A., Feng, Q., Mao, C., Kiviat, N.B., & Xi, L.F. (2009). Sequence variation of human papillomavirus type 16 and measurement of viral integration by quantitative PCR. *Journal of clinical microbiology*, no. 47, v. 3, pp. 521-526.
2. Bruni, L., Diaz, M., Castellsagué, M., Ferrer, E., Bosch, F.X., & de Sanjosé, S. (2010). Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *Journal of Infectious Diseases*, no. 202 (12), pp. 1789-1799.
3. Fakhry, C., Westra, W.H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J.A., Pinto, H., Forastiere, A., & Gillison, M.L. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*, no. 100, pp. 261-269.
4. Saunier, M., Monnier-Benoit, S., Mauny, F., Dalstein, V., Briolat, J., Riethmuller, D., Kantelip, B., Schwarz, E., Mougin, C., & Prétet, J.L. (2009). Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *Journal of clinical microbiology*, no. 46, pp. 3678-3685.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ У РАБОЧИХ НЕФТЯНЫХ ПРОМЫСЛОВ СИБИРИ

Е.Н. Ильинских, Е.В. Замятина

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Н.Н. Ильинских

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

E-mail: nauka-tomsk@yandex.ru

CYTOGENETIC EFFECTS OF TICK-BORNE INFECTIONS IN WORKERS OF OIL FIELDS IN SIBERIA

E.N. Ilyinskikh, E.V. Zamyatina

Scientific Supervisor: Prof., Dr. N.N. Ilyinskikh

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

E-mail: nauka-tomsk@yandex.ru

Abstract. *This work consisted in monitoring of the cytogenetic effects in groups of oilfield workers infected with tick-borne infections: a group of patients with the coinfection of tick-borne encephalitis (TBE) and tick-borne ixodine borreliosis (TBB) in comparison with two groups of patients with mono-infection of one of these diseases. A total of 46 patients were examined including 12 ones with coinfection, 10 ones with TBB, and 24 individuals with TBE. Their peripheral blood samples for the chromosomal assay were obtained from the patients soon after being admitted to the hospital. In addition, the blood samples were repeatedly obtained from the same patients in 30, 60 and 180 days after being discharged from the hospital. The blood samples of healthy donors were used as the controls. It was found that in 2 day after being admitted to the hospital the frequency of cytogenetically damaged cells was significantly higher both in the coinfecting (CI) and mono-infected patients than in the controls ($p < 0.01$). There were significant increases in the frequencies of both aneuploid and polyploid cells as well as in the lymphocytes with structural chromosomal aberrations, predominantly chromatid breaks. Most of the aneuploid cells belonged to the hypoploid type. The highest frequency of the aberrations was found in chromosome 2. In case of the full recovery (without chronicity), both the CI and TBE groups showed that the frequency of the cytogenetically damaged cells become statistically indistinguishable from the controls only in 6 months after the clinical recovery. In the patients with TBB, it occurs in a month after the clinical recovery.*

Введение. В ранее проведенных нами исследованиях [1, 2] впервые в нашей стране было установлено, что вирулентный штамм вируса клещевого энцефалита способен индуцировать существенное увеличение числа анеуплоидных клеток и клеток с хромосомными aberrациями. Имеющиеся на сегодняшний день сведения о цитогенетических последствиях клещевых инфекций не позволяют ответить на основной вопрос, который возникает в процессе лечения и реабилитации больного: как быстро и в какие сроки происходит восстановление цитогенетического гомеостаза организма у переболевшего человека.

Настоящая работа посвящена мониторингу цитогенетических последствий у рабочих нефтепромыслов переболевших микст инфекциями: клещевым энцефалитом и клещевым боррелиозом, по сравнению с моно инфекцией одним из этих заболеваний.

Материалы и методы исследования. Всего обследовано 57 больных – рабочих нефтепромыслов: 15 больных с коинфекцией, 14 с – иксовым клещевым боррелиозом и 28 – с клещевым энцефалитом. Возраст больных был от 21 до 44 лет. Взятие образцов крови проводили из локтевой вены сразу же после госпитализации. Кроме того, через 30, 60 и 180 суток после выписки из больницы проводили повторное взятие крови у тех же лиц. У всех обследованных больных с помощью полимеразной цепной реакцией (ПЦР) подтверждено наличие нуклеиновых кислот принадлежащих инфекционным агентам в плазме крови пациента. Предварительно у каждого обследованного было взято информированное согласие на проведение цитогенетического исследования. В качестве интактного контроля изучены метафазные пластинки у 24 здоровых доноров станции переливания крови. Культивирование лейкоцитов крови, приготовление препаратов для анализа проводили стандартно общепринятым методом. У каждого больного изучали не менее 100 клеток. Все препараты предварительно зашифровывали. Для контроля использовали кровь здоровых доноров той же возрастной группы, что и больные. Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета программ Statistica v. 6.0. Частоты наблюдаемых кариопатологий рассчитывали в программе “The EH Software Program, Rockefeller University, NY” (США). Различия сравниваемых результатов ($M \pm m$, где M – выборочное среднее арифметическое, m – ошибка среднего арифметического) считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Установлено, что у больных коинфекцией в начале болезни (1-2 день госпитализации) число клеток с цитогенетическими нарушениями было в 5,6 раза выше чем в группе здоровых доноров ($12,2 \pm 2,3\%$ и $2,18 \pm 0,49\%$ при $p < 0,01$), у больных клещевым энцефалитом в 3,9 раза выше, чем в интактном контроле (соответственно $8,46 \pm 1,82$ и $2,18 \pm 0,49\%$, при $p < 0,01$), а у больных иксовым клещевым боррелиозом – в 1,8 раза ($3,92 \pm 0,22\%$, при $p < 0,05$). Во всех случаях показано существенное увеличение числа анеуплоидных и полиплоидных клеток, а также клеток со структурными нарушениями хромосом. Среди анеуплоидных клеток преобладали гипоплоидные. У больных клещевым энцефалитом и у больных с коинфекцией закономерно чаще отсутствовали хромосомы из группы D и G. Полиплоидные клетки были в основном тетраплоидными, в интактном контроле они встречались очень редко, а у больных с коинфекцией и у больных иксовым клещевым боррелиозом – гораздо чаще. У больных клещевым энцефалитом и у больных с коинфекцией более половины из всех хромосомных aberrаций относились к хроматидным разрывам. Хромосомные разрывы наблюдались только у некоторых больных. У больных клещевым энцефалитом и у больных с коинфекцией наиболее часто aberrации обнаруживались в хромосоме 2. Дефицит числа нарушений наблюдали в хромосомах групп C, D и E, при этом в хромосомах групп F и G вообще не было отмечено структурных нарушений хромосом. Повышенное число разрывов обнаружено в теломерных районах длинных плеч хромосом групп A, B, C, D. Повторное обследование переболевших больных клещевым энцефалитом и больных с коинфекцией, проведенное через 1 месяц после выписки из больницы, не выявило значимого снижения числа клеток с цитогенетическими нарушениями. Через 3 месяца наблюдается процесс нормализации кариотипа переболевших. Через 6 месяцев частота клеток с цитогенетическими нарушениями нормализуется до

уровня контроля. У больных иксовым клещевым боррелиозом нормализация кариотипа отмечена уже через 1 месяц после госпитализации. Известно, что вирусы способны индуцировать образование анеуплоидных и полиплоидных клеток [1]. У больных клещевым энцефалитом, в гипоплоидных клетках отсутствовали хромосомы группы D и G. Это ядрышкообразующие хромосомы и агенты, тормозящие распад ядрышка при делении клетки могут повлиять на процессы расхождения этих хромосом в митозе [2]. В лейкоцитах больных разрывы локализованы в основном в теломерных и околоцентромерных районах, которые, как известно, сформированы гетерохроматином. Полученные сведения соответствуют общепринятому представлению, что гетерохроматиновые районы наиболее чувствительны к действию большинства мутагенных факторов [1]. Такая однотипность наблюдаемых поражений хромосом, индуцированных различными инфекционными агентами, позволяет предположить наличие каких-то общих механизмов в их возникновении. В этом отношении наиболее апробирована гипотеза, связанная с деятельностью иммунной системы, одной из функций которой является устранение из организма генетически измененных клеток [3,4], в связи с чем, нормализацию числа цитогенетически измененных клеток в организме переболевшего человека следует ожидать при восстановлении способности иммунной системы поддерживать цитогенетический гомеостаз организма.

Заключение. Клещевые инфекции сопровождаются значимо повышенным уровнем цитогенетических нарушений на протяжении первых трех месяцев после клинического выздоровления. В отсутствии хронизации полная нормализация кариотипа у больных клещевым энцефалитом и у больных с коинфекцией клещевого энцефалита и иксового клещевого боррелиоза наблюдалась только через 6 месяцев после клинического выздоровления. У больных иксовым клещевым боррелиозом это происходило через 1 месяц после госпитализации. Предполагают, что появление цитогенетических нарушений в иммунокомпетентных клетках связано с активным образованием свободных радикалов кислорода и оксида азота, повреждающих белки и ДНК. Поэтому элиминация таких дефектных клеток, чаще происходит путем апоптоза и с этим процессом тесно связано восстановление способности иммунной системы поддерживать цитогенетический гомеостаз организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского фонда гуманитарных исследований 15-06-10190 и Российского фонда фундаментальных исследований № 16-44-700149.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ильинских Н.Н., Ксенц А.С., Ильинских Е.Н. Микроядерный анализ в оценке цитогенетической нестабильности. – Томск: Изд-во Томского педагогического университета, 2011. – 312 с.
2. Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н. Влияние вируса клещевого энцефалита на хромосомный аппарат клеток человека // Цитология и генетика. – 1976. – Т. 10. – № 4. – С. 331–333.
3. Ilyinskikh N.N., Ilyinskikh I.N., Ilyinskikh E.N. Infectious mutagenesis (Cytogenetic effects in human and animal cells as well as immunoreactivity induced by viruses, bacteria and helminthes). – Saarbrücken (Germany): LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. – 218 p.
4. Sullivan K.E., Stiehm E.R. Stiehm's immune deficiencies. – Amsterdam: Academic Press (an imprint of Elsevier), 2014. – 456 p.

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У РАБОТНИКОВ
ЯДЕРНОГО ПРОИЗВОДСТВА, ПОДВЕРГАВШИХСЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОМУ
РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ**

Д.С. Исубакова^{1,2}, Е.В. Брониовская¹, Т.В. Усова¹

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

¹Северский биофизический научный центр ФМБА России

Россия, Томская обл., ЗАТО Северск, г. Северск, пр. Коммунистический, 87, 636013

²НИИ онкологии Томского НИМЦ

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

E-mail: isubakova.daria@yandex.ru

**CYTOGENETIC ABNORMALITIES IN BLOOD LYMPHOCYTES OF THE NUCLEAR
PRODUCTION EMPLOYEES EXPOSED TO LONG-TERM OCCUPATIONAL IRRADIATION**

D.S. Isubakova^{1,2}, E.V. Bronikovskaya¹, T.V. Usova¹

Scientific Supervisor: Dr. N.V. Litvyakov

¹Seversk Biophysical Research Centre of the Federal Medical and Biological Agency

Russia, Tomsk Region, Seversk, Kommunisticheskyy av., 87, 636070

²Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences

Russian Federation, Tomsk, Cooperative str., 5, 634009

E-mail: isubakova.daria@yandex.ru

Abstract. *The main aim of this study was to analyze the data on the frequency and spectrum of cytogenetic abnormalities in the cohort of Siberian Group of Chemical Enterprises (SGCE) employees, considering their age and sex, type of radiation and external irradiation dose. There were studied the samples obtained from 1 300 SGCE employees exposed. We have found that the dose dependence of quantity of aberrant cells, chromosome abnormalities, point fragments and dicentric chromosomes in SGCE workers is non-linear. In case of irradiation dose is to 10 mSv there has been observed the significant decreasing the number of aberrant cells, chromosome and chromatid abnormalities as compared with the control group, this corresponds to the phenomenon of the radiation hormesis. There has been observed significant rising of a quantity of aberrant metaphases and chromosome and chromatid abnormalities starting from dosage range of 40–100 mSv. In dosage range of 100–500 mSv the dose dependence has a plateau and the frequency of cytogenetic abnormalities is constant, but significance is increasing relatively the control group.*

Введение. Образование хромосомных и генных мутаций в различных клетках-мишенях является характерным эффектом действия ионизирующих излучений [1–3]. Наиболее объективным и достаточно хорошо разработанным способом биологической индикации мутагенного воздействия на организм человека ионизирующего излучения является цитогенетическое исследование лимфоцитов периферической крови, которое заключается в учёте хромосомных aberrаций (ХА) в культивируемых лимфоцитах периферической крови [4]. Цель настоящей работы: исследование частоты и спектра

нестабильных цитогенетических аномалий в лимфоцитах крови у здоровых работников ядерного производства, подвергавшихся хроническому радиационному воздействию низкой интенсивности.

Материал и методы исследования. В исследуемую группу вошли 1 300 работников Сибирского химического комбината (СХК), которые подвергались хроническому воздействию внешнего (γ -излучение), внутреннего (за счёт инкорпорированного ^{239}Pu) или сочетанного (внешнего и внутреннего) облучения в процессе профессиональной деятельности. Для всех обследованных лиц был проведён стандартный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови. У каждого индивида обследовали не менее 300 метафаз. Анализировали все виды aberrаций хромосом, распознаваемых без кариотипирования: aberrантные клетки, aberrации хромосомного типа, точечные фрагменты, дицентрические хромосомы, кольцевые хромосомы, хроматидные обмены.

Результаты. Установлено, что частота ХА не коррелировала с возрастом и гендерной принадлежностью работников СХК. Для индукции ХА определяющим фактором является хроническое внешнее облучение. При дополнительной радиационной нагрузке за счёт инкорпорированного ^{239}Pu в крови работников с сочетанным облучением по сравнению с работниками, подвергавшимися только внешнему облучению (при равных дозовых нагрузках по внешнему облучению), снижена частота ХА.

Нелинейный характер дозовой зависимости наблюдался для частоты aberrантных клеток (рис. 1а), aberrаций хромосомного типа (рис. 1б), точечных фрагментов и дицентрических хромосом.

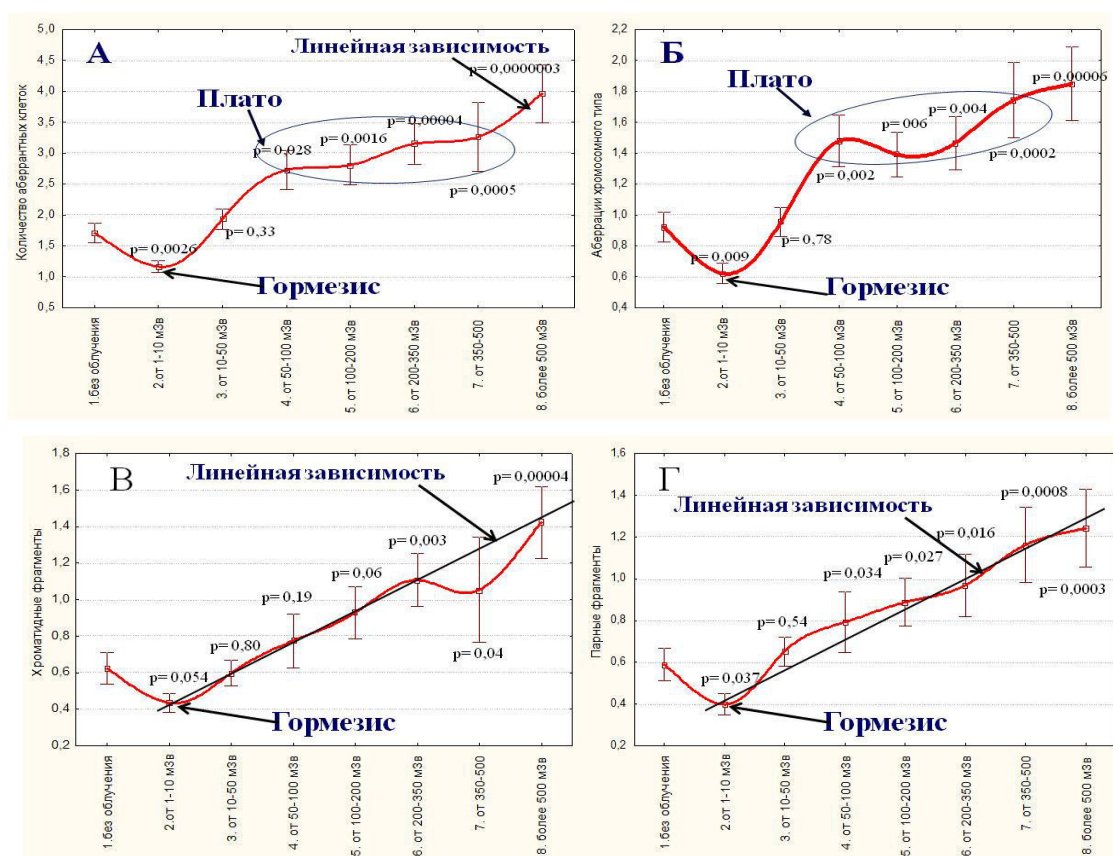


Рис. 1. Зависимость частоты цитогенетических аномалий у работников СХК от дозы внешнего облучения. А – кривая дозовой зависимости для частоты aberrантных клеток; Б – кривая дозовой зависимости для aberrаций хромосомного типа; В – кривая дозовой зависимости для точечных фрагментов и дицентрических хромосом; Г – кривая дозовой зависимости для парных фрагментов

При облучении в дозе $> 0\text{--}10$ мЗв наблюдалось статистически значимое уменьшение частоты аберрантных клеток, аббераций хроматидного и хромосомного типов по сравнению с контролем (рис. 1), что соответствует явлению радиационного гормезиса [5, 6]. При хроническом радиационном воздействии в дозах менее 40 мЗв не отмечается значимого повышения частоты ХА, что может свидетельствовать в пользу известной пороговой модели. Начиная с диапазона доз $> 40\text{--}100$ мЗв (для дицентриков с диапазона $> 100\text{--}200$ мЗв), отмечается статистически значимое увеличение выхода ХА. В диапазоне доз 100–500 мЗв на дозовой зависимости имеется плато, уровень цитогенетических аномалий не увеличивается и только возрастает статистическая значимость различий с контролем. Предполагается, что образование плато на дозовой кривой обусловлено активностью систем репарации и апоптоза. После 500 мЗв частота ХА линейно возрастает с дозой внешнего облучения. Однако для хроматидных и парных фрагментов ранее установленная нами [7] нелинейная зависимость не подтвердилась. Для хроматидных фрагментов (рис. 1в) и парных фрагментов (рис. 1г) отмечается линейная дозовая зависимость. У носителей, имеющих в лимфоцитах крови транслокации и хроматидные обмены, наблюдается достоверно более высокий уровень дозы внешнего облучения. Дозовая зависимость не была показана для кольцевых хромосом, хроматидных обменов, мультиаберрантных клеток и транслокаций.

Выводы. Проведённое исследование позволило установить пороговые дозы низкоинтенсивного облучения для индукции ХА и дозовую зависимость, что обуславливает возможность дальнейшего совершенствования существующей системы радиационной безопасности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бочков Н.П. Анализ типов аберрантных клеток – необходимый элемент биологической индикации облучения // Мед. радиология и радиац. безопасность. – 1993. – № 2. – С. 32–35.
2. Бочков Н.П., Чеботарёв А.Н., Катосова Л.Д., Платонова В.И. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных аббераций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 4. – С. 549–557.
3. Rodrigues A. S., Oliveira N. G., Monteiro O. G., Léonard A., Rueff J. (2005). Use of cytogenetic indicators in radiobiology. *Radiat. Prot. Dosim.*, no. 115. pp. 455–460.
4. IAEA (1986). Biological dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment. IAEA technical reports series no. 260.
5. Кузин А.М. Идеи радиационного гормезиса в атомном веке. – М.: Наука, 1995. – С. 158
6. Ивановский Ю.А. Радиационный гормезис. Благоприятны ли малые дозы ионизирующей радиации? // Вестник ДВО РАН. – 2006. – № 6. – С. 86–91.
7. Литвяков Н.В., Фрейдин М.Б., Халюзова М.В., Сазонов А.Э., Васильева Е.О., Альбах Е.Н., Исубакова Д.С., Блинов А.П., Родионова В.И., Кутько А.А., Карпов А.Б., Тахауов Р.М. Частота и спектр цитогенетических аномалий у работников Сибирского химического комбината // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2014. – Т. 54, № 3. – С. 283–296.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗНЫХ ВИДОВ
АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ ПАТОСПЕРМИИ**

С.И. Камалова, В.А. Машанова

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Т.Г. Боровская

«Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634034

E-mail: repropharm@yandex.ru

**EXPERIMENTAL STUDY OF EFFECTIVENESS OF DIFFERENT TYPES ANTIOXIDANT
THERAPY IN THE TREATMENT OF PATHOSPERMIA**

S.I. Kamalova, V.A. Maschanova

Scientific Supervisor: Prof., Dr. T.G. Borovskaya

Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named E.D. Goldberg "Federal state budgetary scientific institution" Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences "

Russia, Tomsk, Lenina str., 3, 634034

E-mail: repropharm@yandex.ru

Abstract. *Efficacy of antioxidants (dibornol, 4-hydroxy-2,6-diizobornilfenol) in an experimental model pathospermia. It was found that was the most effective dibornol. The redox potential of the male germ cells in the background of his administration, and consistent with that of intact animals.*

Введение. В последние годы доля мужского фактора в бесплодном браке достигает 50 %, что во многом обусловлено существенным возрастанием уровня экзогенных токсических воздействий. В 20-50% случаев оно связано с патоспермией [1, 2]. Сегодня мало кто сомневается в том, что к числу основных причин этой формы бесплодия относится возрастание уровня свободных радикалов, которое, как известно, инициируется практически всеми видами внешних повреждающих факторов. Повышенная чувствительность мужских половых клеток к окислительному стрессу связана с высоким содержанием в их мембране полиненасыщенных жирных кислот [3]. Целесообразность использования целого ряда антиоксидантов для лечения патоспермии в настоящее время, подтверждена в экспериментальных и клинических исследованиях [2, 3, 4]. Очевидно, что результатом антиоксидантного воздействия должно быть создание оптимальных условий для нормального функционирования мужских половых клеток. Эти условия должны обеспечивать постоянство уровня про-антиоксидантного баланса мужских половых клеток, который индивидуален для каждой ткани. Результаты оценки эффективности разных антиоксидантов при патоспермии показывают, что степень выраженности терапевтического эффекта при этом существенно варьирует. Это связано, очевидно, с тем, что антиоксиданты не взаимозаменяемы. Активность каждого из них зависит от среды и условий его функционирования. Иницирующим моментом данной работы явился тот факт, что вопросы эффективности разных видов антиоксидантной терапии при патоспермии исследованы в настоящее время фрагментарно [4]. В настоящей работе изучена эффективность четырех антиоксидантов. Три из группы полифенолов (диборнол, 4-гидрокси-

метил-2,6 диизоборнилфенол - ГМДФ, дигидрокверцетин – ДГК) и один (мексидол) – производное 3-оксипиридина, эффективность которого была показана в клинике [4].

Цель. Целью настоящего исследования явилась экспериментальная оценка эффективности разных видов антиоксидантной терапии при мужской инфертильности, обусловленной патоспермией.

Материалы и методы. Эксперименты были проведены на 30 аутбредных крысах самцах сток CD (возраст 3 мес). Эффективность антиоксидантов оценивали в экспериментальной модели мужского бесплодия, вызванного однократным внутривенным введением цитостатического препарата этопозид (в дозе 30 мг/ кг). Оценку эффективности препаратов проводили по общему количеству сперматозоидов (ОКС), проценту их подвижных (ПФ) и патологических форм (ПатФ) [5]. Прооксидантную (Про) и антиоксидантную (АОА) активности гомогената мужских половых клеток определяли методом хемилюминисценции с помощью кюветного биолуминометра Lumat LB9507. В качестве количественного показателя использовали уровень светосуммы (Sm), который выражали в RLU/1г ткани/сек, где RLU (относительная единица света relative light units = 10 фотонам). Про - антиоксидантный баланс рассчитывали как отношение SmАОА к SmПро [6]. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием непараметрического U критерия Манна-Уитни.

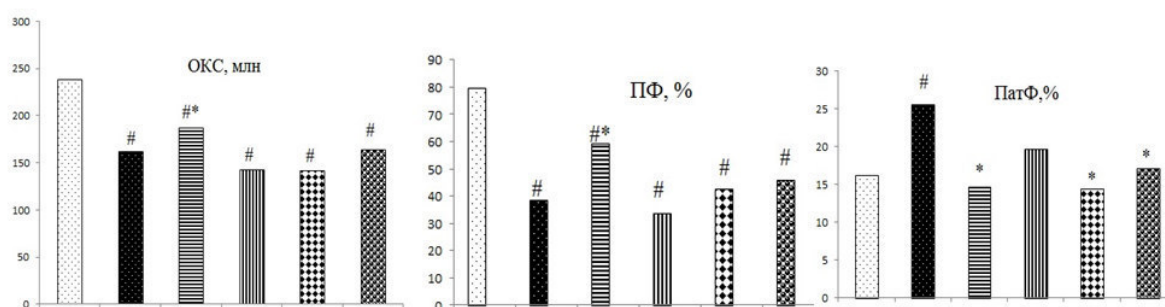


Рис. 1. Морфофункциональное состояние мужских половых клеток крыс на фоне антиоксидантной терапии при патоспермии

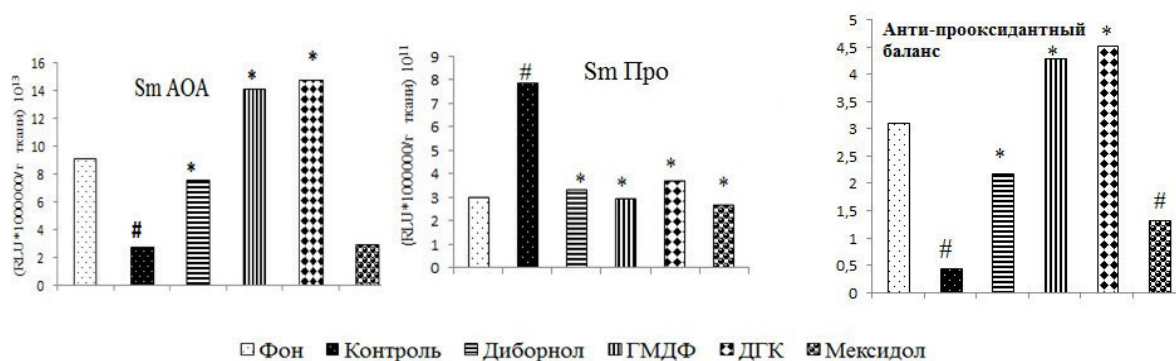


Рис. 2. Про-антиоксидантный баланс мужских половых клеток крыс на фоне антиоксидантной терапии при патоспермии

Результаты. Результаты представлены на рисунке 1 и 2. Установлено, что в группе крыс, получавших этопозид, ОКС снизилось на 45% , ПФ – на 49% от контроля, процент ПатФ возрос – в 1,6 раза (Рис. 1). Светосумма антиоксидантной активности (SmAOA) мужских половых клеток снизилась, более чем в 3 раза, а светосумма прооксидантной активности (SmПро) в 2,7 раза, про- антиоксидантный баланс сократился почти в 7 раз (Рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о развитии патоспермии, которая сопровождалась выраженным окислительным стрессом. ОКС и ПФ почти во всех экспериментальных группах животных статистически значимо не превышали контрольные значения. Исключение составила группа животных, получавших диборнол. Оба показателя на фоне его введения составили 78-79% от контроля. Процент ПатФ мужских половых клеток достоверно снижался во всех экспериментальных группах. Эффективность антиоксидантов, судя по этому показателю, повышалась в следующем порядке: ГМДФ → Мексидол → ДГ = Дб. Причем процент ПатФ при введении последних достигал фоновых значений (Рис.1). Показатели SmAOA достоверно повышались по сравнению с контролем после введения почти всех исследуемых антиоксидантов, кроме мексидола. У крыс, получавших ДГ и ГМДФ, он возрос (в 1,6 раз) и даже превосходил показатели группы фона. Наиболее близкие значения к фону выявлялись при использовании диборнола. Уровень SmПро оказался статистически значимо сниженным во всех экспериментальных группах. Степень выраженности этого эффекта была сходной. Про-антиоксидантный баланс возрастал на фоне введения всех антиоксидантов, кроме мексидола. Наиболее приближенным к фону этот показатель был в группе животных, получавших диборнол (Рис. 2).

Выводы. 1. Различные виды антиоксидантной терапии обладают не одинаковой эффективностью в экспериментальной модели патоспермии. 2. Наиболее эффективным средством терапии является антиоксидант диборнол. Про-антиоксидантный баланс мужских половых клеток на фоне его введения в наибольшей степени соответствовал фоновым значениям. 3. Фармакологическая активность такого рода лекарственных воздействий при данной патологии, очевидно, не связана с принадлежностью к определенному классу антиоксидантов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Punab M, Poolamets O, Paju P, Vihlajev V, Pomm K, Ladva R, Korrovits P, Laan M. (2017). Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Human Reproduction*, no.1, pp. 18-31.
2. Трухан Д.И. Роль и место антиоксидантов в комплексной терапии мужского бесплодия // *Consilium medicum*. – 2015. – Т. 17. - № 7. – С. 37 – 43.
3. Brody S.A. Мужское бесплодие и окислительный стресс: роль диеты, образа жизни и пищевых добавок // *Андрология и генитальная хирургия*. - 2014. – Т.15. - №3. – С. 33-41.
4. Евдокимов В.В. Влияние различных факторов на параметры эякулята человека *in vitro* // *Андрология и генитальная хирургия*. – 2015. – Т.16. – № 4. – С. 40 – 45.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
6. Muller C.H., Lee T.K., Montano M.A. (2013). Improved chemiluminescence assay for measuring antioxidant capacity of seminal plasma. *Methods Mol. Biol.*, no. 927, pp. 363-376.

**ПЛАНИРОВАНИЕ НЕЙТРОН-ЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ С КОМПЛЕКСАМИ ГАДОЛИНИЯ ПО
ДАНЫМ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ С ПАРАМАГНИТНЫМ
КОНТРАСТИРОВАНИЕМ**

Н.И. Карпович

Научный руководитель: профессор, д.м.н. В.Ю. Усов

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

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

E-mail: karpovichnatalia88@gmail.com

**PLANNING FOR NEUTRON CAPTURE THERAPY WITH GADOLINIUM ACCORDING TO
MAGNETIC RESONANCE IMAGING WITH CONTRAS ENHANCEMENT**

N.I. Karpovich

Scientific Supervisor: Prof., Dr. V.Yu. Usov

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

E-mail: karpovichnatalia88@gmail.com

Abstract. *In the present study, we performed a method for quantitative analysis for estimate a content of the neutron-acceptors in tumor tissues for planning gadolinium NCT. The study was conducted with dynamic contrast-enhanced MRI with Gd-DTPA. The phantoms experiments showed the dependence of the MR signal intensity from the drug concentration in the tumor. To describe the absorption of Gd-DTPA in tumor a classical passive transport GRP model was used. We described the procedure of tumor blood flow measurement. It was proved that the blood flow value depends on the degree of tumor malignancy. The implementation of the described planning NCT method in clinical practice will allow to determine the onset of irradiation, to bring the maximum dose to therapeutic focus and carry out personalization of treatment in order to increase the effectiveness of NCT.*

Введение. Нейтрон-захватная терапия (НЗТ) с комплексами гадолиния является наиболее многообещающим методом избирательного поражения злокачественных новообразований. Она практически безальтернативна при лечении агрессивных и радиорезистентных форм опухолей головного мозга. Эффективность НЗТ определяется максимальной дозой, которая создается в опухолевых клетках продуктами реакции захвата тепловых нейтронов атомами ^{157}Gd . Если концентрация гадолиния будет недостаточна, не все опухолевые клетки погибнут, в противном случае будет превышена толерантность нормальных тканей. Для успешной реализации НЗТ необходимо знать параметры индивидуального накопления гадолиния непосредственно в организме пациента, которые варьируются у разных больных в широких пределах. Для оценки накопления ^{157}Gd в опухолевых и нормальных тканях был разработан безопасный и нетравматичный способ с использованием динамической МРТ и введением парамагнитного контраста, содержащего гадолиний (Gd-ДТПА, Магневист).

Цель работы: разработка методов оценки кинетики накопления парамагнитного контрастного препарата, содержащего гадолиний, в опухоли и окружающих тканях на основании динамической МРТ для расчета его оптимального дозирования при проведении НЗТ.

Материалы и методы. Для описания поглощения Gd-ДТПА опухолью была использована классическая модель пассивного транспорта Гьедде-Рутланда-Патлака (ГРП), которая также широко применяется при радионуклидных исследованиях [1]. Важно отметить, что транспорт Магневиста в опухоль определяется двумя основными факторами: доставкой его с кровью, то есть тканевым кровотоком опухоли и степенью проницаемости эндотелия капиллярного русла опухоли [2]. Пусть транспорт Gd-ДТПА в течение первых минут после инъекции носит односторонний характер, тогда справедливо соотношение (1):

$$\frac{dC_{tum}(t)}{dt} = K \cdot C_h \quad (1)$$

где $C_{tum}(t)$ – концентрация препарата в опухоли, C_h – в крови, K – транспортная константа «кровь→опухоль». Физический смысл K – показатель клиренса крови (или кровотока опухоли). Величина K зависит от степени злокачественности опухоли. Коэффициент K может быть определен на линейном участке графика ГРП.

Первым шагом при планировании НЗТ является обозначение величины поглощенной дозы, которую необходимо доставить к терапевтическому очагу. Формула, по которой рассчитывается мощность дозы излучения, возникающего в процессе реакции захвата тепловых нейтронов ^{157}Gd , приведена в [3], согласно этому уравнению значение концентрации Gd-ДТПА в опухоли, необходимое для получения заданной мощности поглощенной дозы можно рассчитать по формуле (2):

$$C_{tum} = \frac{dD}{dt} \cdot \frac{M}{N_a \gamma_{EK}} \quad (2)$$

где dD/dt – мощность дозы, Φ – средняя мощность потока тепловых нейтронов в зоне опухоли, C_{tum} – концентрация препарата в опухоли; N_a – число Авогадро; M – молекулярная масса ^{157}Gd ; σ – сечение реакции захвата тепловых нейтронов ядром ^{157}Gd ; E – энергия продуктов реакции нейтронного захвата; K – коэффициент согласования размерности.

Следующим шагом при планировании НЗТ необходимо установить зависимость между необходимой концентрацией препарата в опухоли C_{tum} (2) и интенсивностью МР-сигнала. Для этого выполнялось исследование МР-томограмм фантомов с известным содержанием Gd-ДТПА в плазме. У пациентов после внутривенного введения Магневиста производился отбор проб крови каждые 30 с, вслед за этим пробы помещались в центрифугу для осаждения эритроцитов. Наилучшую аппроксимацию зависимости интенсивности Т1-взвешенного изображения фантома от содержания в нем Gd-ДТПА обеспечивает функция $IS = 743 + 1495 \cdot (1 - e^{-(C_{tum}/5.124)})$ [2]. Таким образом последнее уравнение позволяет трансформировать изменение интенсивности МР сигнала в величину абсолютного содержания контрастного агента в ткани.

Результаты. В качестве примера для оценки накопления контрастного препарата Магневист было рассмотрено МР исследование пациента с недифференцированной глиомой. Пациент проходил обследование на высокопольном МР-томографе в «НИИ Кардиологии» г. Томска до лечения, после лучевой- (гамма) и химиотерапии и через месяц после данных процедур. Контрастный препарат вводился внутривенно в диагностической дозе $C_0 = 2$ мл/10 кг веса тела. В конце исследования (180 с) очертания новообразования визуализировались наиболее ярко. С помощью стандартных средств на МР-изображениях в разные моменты времени (через каждые 30 с) выделялись области, соответствующие наибольшей аккумуляции Магневиста в опухоли, также был выделен участок здоровой ткани. После этого строились зависимости интенсивности МР-сигнала от времени после введения Gd-ДТПА.

Результаты представлены на рис. 1 и подтверждают высокую специфичность комплекса Gd-ДТПА к опухолевым клеткам наряду с минимальным накоплением его в здоровых тканях.

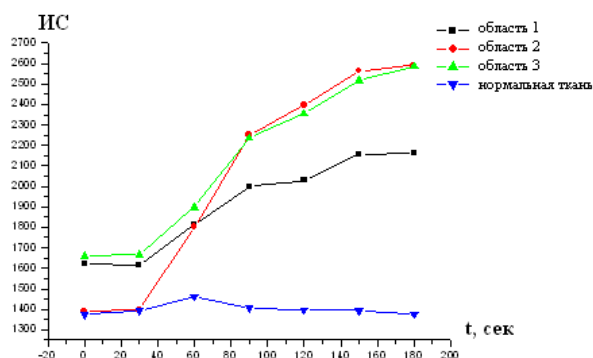


Рис. 2. Изменение интенсивности T1-взвешенного сигнала в зависимости от времени после инъекции контрастного вещества

На графике наблюдается характерное плато, что и делает возможным проведение НЗТ.

После всех ранее описанных этапов при необходимости проводят корректировку диагностической дозы C_0 препарата Магневист для дальнейшего проведения НЗТ. Если наблюдаемая на участке плато концентрация комплекса Gd-ДТПА в опухоли C_{tum} отличается от необходимой для достижения заданной поглощенной дозы, то количество вводимого препарата Магневист корректируют, опираясь на модель линейного транспорта.

Заключение. Разработан способ количественной оценки содержания гадолиния в опухоли и окружающих тканях. Проведены фантомные эксперименты для определения зависимости интенсивности МР сигнала от концентрации контрастного препарата в ткани. Была исследована аккумуляция Gd-ДТПА при динамической МРТ, в результате можно судить о целесообразности проведения терапии в конкретных случаях. Описан порядок вычисления опухолевого кровотока K , который имеет максимальные значения при высокозлокачественных опухолях. Реализация описанного метода планирования НЗТ в клинической практике позволит подводить максимальную дозу облучения к терапевтическому очагу и проводить персонализацию лечения с целью повышения эффективности НЗТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Усов В.Ю., Питерс А.М., Барышева Е.В. Количественная оценка кровотока злокачественных опухолей костей и мягких тканей по данным динамической скintiграфии с ^{99m}Tc -МИБИ // Медицинская визуализация. – 2003. – № 4. – С. 114–123.
2. Усов В.Ю., Величко О.Б. Оценка эндотелиальной проницаемости опухолей мозга методом динамической магнитно-резонансной томографии с контрастированием Магневистом на анизотропном МР-томографе // Вестник рентгенологии и радиологии. – 2001. – №3. – С. 22–29.
3. Корякин С.Н., Ульяненко С.Е. Использование меченного радиоактивным йодом меркаптододекабората натрия для планирования нейтронно-захватной терапии // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2005. – Т. 50. – №2. – С. 56–59.

**ДИНАМИКА СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МИЕЛИНА ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ
ЛОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС**

А.А.Кисель

Научный руководитель: профессор, д.б.н. М.Ю. Ходанович
Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050
E-mail: kisell.alena@gmail.com

DYNAMICS OF MYELIN CONTENT DECREASE IN THE RAT STROKE MODEL

A.A. Kisel

Scientific Supervisor: Prof., Dr. Sc. M.Yu. Khodanovich
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina ave, 36, 634050
E-mail: kisell.alena@gmail.com

Abstract. *A majority of studies were usually focused on neuronal death after brain ischemia, however, stroke affects all cell types including oligodendrocytes that form myelin sheath in the CNS. Our study is focused on the changes of myelin content in ischemic core and neighbor structures in early terms (1, 3 and 10 days) after stroke. Stroke modeled with middle cerebral artery occlusion (MCAo) in 15 male rats that were divided in three groups by time-points after operation. Brain sections were histologically stained with Luxol Fast Blue (LFB) for myelin quantification. The significant demyelination was found in the ischemic core, corpus callosum, anterior commissure, whereas myelin content was increased in caudoputamen, internal capsule and piriform cortex compared with the contralateral hemisphere. The motor cortex showed a significant increase of myelin content on the 1st day and a significant decrease on the 3rd and 10th days after MCAo. These results suggest stroke influences myelination not only in ischemic core but also in distant structures.*

Введение. Сосудистые заболевания мозга занимают второе место среди ведущих причин смертности после ишемической болезни сердца [1]. Основное внимание при изучении ишемического инсульта уделяется его влиянию на нейроны, в то же время это заболевание поражает абсолютно все типы клеток мозга, в том числе и олигодендроциты, формирующие миелиновую оболочку - компонент, крайне важный для нормального функционирования нервной системы. Целью данного исследования было изучение изменения степени миелинизации различных структур белого и серого вещества после моделирования локальной ишемии головного мозга.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проводился на 15 половозрелых самцах крыс линии *Sprague-Dawley* (масса 250-270 г). Модель ишемического инсульта создавалась путем обратимой окклюзии срединной церебральной артерии (*middle cerebral artery occlusion, MCAo*) [2]. В левую внутреннюю сонную артерию вводился нейлоновый филамент с силиконовым наконечником (*Doccol, USA*), который перекрывал кровоток в МСА. Ишемический эпизод начинался с момента введения филамента к МСА и продолжался 1 час, после чего филамент извлекался. Операция осуществлялась под изофлурановым наркозом (1,5-2% изофлуран в кислороде). Температура тела животного в течение операции поддерживалась на уровне $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. После операции животные были случайным образом

поделены на три экспериментальные группы: 1 сутки, 3 суток и 10 суток. По истечении указанного срока животным под эфирным наркозом проводилась транскардиальная перфузия 4% параформальдегидом. Мозг извлекался, проводилась криопротекция в 10% и 20% растворах сахарозы и заморозка в парах жидкого азота.

Для оценки миелинизации после моделирования ишемического инсульта получали срезы мозга толщиной 10 мкм на криотоме *HM525 (Termoscientific, Germany)*, которые затем окрашивались красителем *Luxol Fast Blue (LFB)* для выявления миелина. Микрофотографии срезов, полученные на микроскопе *Axiolmager Z2 (Carl Zeiss, Germany)*, обрабатывали с помощью программы *ImageJ*. Для исследования были определены несколько структур белого (мозолистое тело *corpus callosum, cc*; передняя комиссура *commissura anterior, ca*; внутренняя капсула *internal capsula, ic*) и серого (стриатум *caudoputamen, cp*; дорзальная (моторная) кора *cortex dorsalis, cxd*; вентральная (пириформная) кора *cortex ventralis, cxv*; таламус *thalamus, thal*) вещества, а также зона ишемического поражения (*lesion, L*), для каждой из которых были выбраны регионы интереса (*region of interest, ROI*), в пределах которых оценивалась оптическая плотность (ОП) окрашивания *LFB*, нормированная по фону. В качестве контроля использовали контралатеральное полушарие, ОП которого принимали за 100%. Статистическая обработка данных проводилась в программе *STATISTICA 10*, значимость различий между полушариями оценивали с помощью критерия χ^2 , статистически значимыми принимали различия с $p < 0,05$.

Результаты. Результаты представлены на рисунках 1 и 2. Как и ожидалось, ишемия привела к снижению содержания миелина в самом очаге поражения ($p < 0,001$) на всех сроках наблюдения, однако при этом ОП *LFB* в зоне *cp*, прилегающей к зоне поражения, значимо увеличилась в 1 сутки после моделирования инсульта.

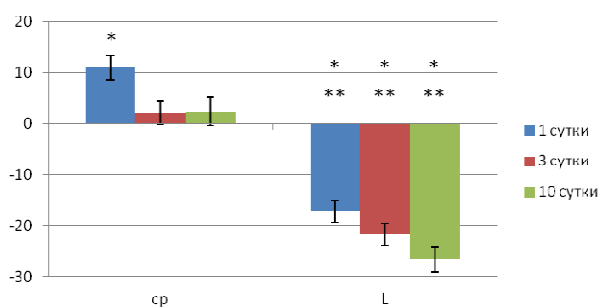


Рис. 1. Изменения миелинизации в зоне ишемического поражения (*lesion, L*) и в *caudoputamen* пораженного полушария (*cp*) относительно контрольного полушария, выраженные в процентах.

Средние $\pm$ стандартная ошибка среднего. Значимые различия между полушариями: * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$

В структурах, не затронутых ишемией напрямую, также наблюдались изменения миелинизации (Рис. 2). Для структур белого вещества на 1 сутки наблюдалось значительное снижение содержания миелина в *cc* и *ca*, которое сохранялось в *cc* и на 3 сутки. На 10 суток в этих структурах изменений не наблюдалось, однако в *ic*, наиболее отдаленной от зоны инсульта, содержание миелина значимо увеличивалось (Рис. 2).

В структурах серого вещества, за исключением *thal* (наиболее удаленной от зоны ишемического поражения структуры), наблюдается как повышение миелинизации (*схд* на 1 сутки, $p<0,05$; и *схв* на 1 и 3 сутки после операции, $p<0,01$ и $p<0,001$ соответственно), так и снижение этого показателя (*схд* на 3 и 10 сутки, $p<0,01$ и $p<0,05$ соответственно) относительно контроля (Рис. 2). Очевидно, изменения степени миелинизации структуры с течением времени может говорить о перераспределении миелина после ишемического воздействия. Причем в структурах серого вещества скорость и/или величина этого перераспределения могут быть более выражены за счет большего содержания воды.

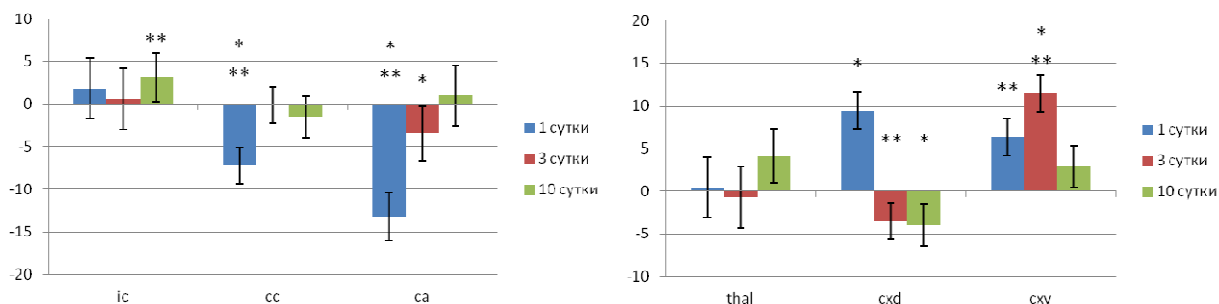


Рис. 2. Изменения миелинизации структур белого (слева) и серого (справа) вещества вне зоны ишемического поражения после моделирования ишемического инсульта относительно контрольного полушария, выраженные в процентах. Обозначения: внутренняя капсула (ic), мозолистое тело (cc), передняя комиссура (ca), таламус (thal), дорзальная (моторная) кора (схд), вентральная (пириформная) кора (схв). Средние $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистическая значимость различий между полушариями: * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в различных структурах головного мозга, даже не попавших под прямое действие ишемии, происходят изменения степени миелинизации, величина и направленность которых зависит от разных факторов: удаленность от очага ишемии, исходная степень миелинизации (белое или серое вещество). Возможными причинами этого может служить плотность вещества в конкретной структуре, процентное содержание воды, а также другие, менее очевидные факторы.

Благодарность. Автор выражает благодарность Аточину Д.Н. за помощь в реализации модели ишемического инсульта, Мустафиной Л.Р. за проведение гистологического окрашивания тканей. Исследование проведено при финансовой поддержке РНФ (проект № 14-45-00040).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 10 ведущих причин смерти в мире: информ. бюл. ВОЗ № 310. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/>. - 4.10.2016.
2. Jackman, K., Kunz, A., Iadecola, C. Modeling Focal Cerebral Ischemia In Vivo. Neurodegeneration: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. - NY: Springer Science+Business Media, LLC, 2011. – pp. 195-209.

**РОЛЬ ГЕНОВ *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* И *RBFOX2* В РЕПАРАЦИИ
РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В КЛЕТКАХ
ОПУХОЛЕВОЙ ЛИНИИ HELA**

В.С. Климова¹, А.В. Агаб², В.С. Фишман³

Научный руководитель: к.б.н. С.А. Васильев²

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

² НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН,
Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки 10, 634050

³ Институт цитологии и генетики СО РАН,
Россия, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10, 630090
E-mail: klimovavs42@gmail.com

**ROLE OF *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* AND *RBFOX2* GENES IN THE RADIATION-INDUCED DNA
DOUBLE STRAND BREAK REPAIR IN HELA TUMOR CELL LINE**

V.S. Klimova¹, A.V. Agab², V.S. Fishman³

Scientific Supervisor: S.A. Vasilyev, PhD²

¹ National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina str. 36, 634050

² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center
of Russian Academy of Science, Russia, Tomsk, Nab. Ushaiki str. 10, 634050,

³ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of Russian Academy of Science, Russia, Novosibirsk,
Lavrentyev av. 10, 630090
E-mail: klimovavs42@gmail.com

Abstract. *It is well known that inter-individual differences of radiosensitivity have genetic causes, such as variations in the level of DNA or expression of DNA repair genes. However, differentially expressed genes which could lead to inter-individual differences in the level of DNA damage remain largely unidentified. In our study we have induced knock-out of THBS1, WHSC1, ADAMTS1 and RBFOX2 genes in HeLa cell line to clarify the effects of these genes on DNA repair and radiosensitivity.*

Введение. Действие ионизирующего излучения на клетки вызывает развитие у них ряда эффектов. Наиболее опасным последствием действия радиации является образование двунитевых разрывов ДНК. В качестве маркеров количества двунитевых разрывов ДНК могут быть использованы фокусы белков γ H2AX и 53BP1 [1, 2]. Сборка фокусов белков γ H2AX и 53BP1, как одно из ключевых событий развития ответа на действие радиации, контролируется большим количеством генетических факторов. Однако, на данный момент гены, дифференциальная экспрессия которых может приводить к изменению уровня повреждений ДНК, изучены слабо. Поэтому проблемой, на решение которой было направлено настоящее исследование, является выявление генов, дифференциальная экспрессия которых может быть связана с различной эффективностью репарации двунитевых разрывов ДНК в соматических клетках человека.

Ранее нами в результате полнотранскриптомного анализа в лимфоцитах периферической крови и фибробластах экстраэмбриональной мезодермы человека была впервые выявлена корреляция экспрессии отдельных генов (*THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2*) со спонтанным уровнем фокусов γ H2AX. Однако, неясно, является ли нарушение функций этих генов причиной изменения радиочувствительности клеток, или, наоборот, их дифференциальная экспрессия является следствием различий в радиочувствительности клеток. Поэтому целью настоящего исследования являлся анализ влияния генов *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2* на репарацию радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования были использованы 4 опухолевые клеточные линии, нокаутные по генам *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2*, созданные на основе опухолевой клеточной линии HeLa. В последовательность каждого из изучаемых генов была внесена мутация, которая привела к нарушению нормального функционирования продукта исследуемого гена. Внесение мутаций в клетки было осуществлено с помощью использования компонентов системы CRISPR/Cas9, а именно генетического вектора, экспрессирующего белок Cas9, и малой некодирующей РНК (гРНК). Для каждого из генов было получено 96 субклонов, для которых был проведен ПЦР-анализ с помощью праймеров, фланкирующих сайты, комплементарные гРНК. Все дальнейшие эксперименты были проведены с одним субклоном для каждого из генов. В качестве такого субклона выбиралась гетерозигота по делеции и дупликации в целевой области. Для всех линий, включая исходную линию HeLa, были проведены эксперименты по воздействию γ -излучения. Часть клеток оставалась контрольной, другую часть клеток подвергали воздействию 2 Гр γ -облучения при комнатной температуре (мощность дозы – 1 Гр/мин). Облучение клеток было проведено на базе онкологического отделения Томского областного клинического диспансера.

Для анализа временной динамики фокусов γ H2AX и 53BP1 (маркеров двунитевых разрывов) фиксации клеток были проведены через 5, 15 и 30 мин, 2, 4, 8, 24 и 48 ч после облучения. Для выявления фокусов белков γ H2AX и 53BP1 проводили иммунофлюоресцентное окрашивание фиксированного материала. Кроме того, с помощью ПЦР в реальном времени был проведен анализ экспрессии генов *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2* во всех нокаутных линиях и исходной клеточной линии HeLa.

Результаты. Спонтанный уровень фокусов γ H2AX был повышен в нокаутных линиях по генам *ADAMTS1* ($1,8 \pm 0,12$ фокусов на клетку), *THBS1* ($3,4 \pm 0,6$ фокусов на клетку), *RBFOX2* ($0,81 \pm 0,09$ фокусов на клетку) и *WHSC1* ($4,91 \pm 0,43$ фокусов на клетку) по сравнению с исходной линией HeLa ($0,8 \pm 0,1$ фокусов на клетку) ($p < 0,05$). Также в нокаутных линиях был повышен и уровень фокусов 53BP1 (*ADAMTS1* – $5,9 \pm 0,2$ и *THBS1* – $7,0 \pm 0,8$, *RBFOX2* – $2,49 \pm 0,15$ и *WHSC1* – $7,21 \pm 4,85$ фокусов на клетку) по сравнению с исходной линией HeLa ($1,2 \pm 0,1$ фокусов на клетку) ($p < 0,05$). Пиковый уровень фокусов γ H2AX и 53BP1 отмечался через 2 ч после облучения. При этом максимальное количество фокусов γ H2AX и 53BP1 наблюдалось в линии, нокаутной по гену *THBS1* ($48,2 \pm 1,9$ и $30,1 \pm 0,9$ фокусов на клетку, соответственно). Это может быть свидетельством повышенной эффективности распознавания двунитевых разрывов ДНК, их репарации и активации контрольных точек клеточного цикла. Напротив, наименьший уровень фокусов γ H2AX и 53BP1 через 2 часа после облучения отмечался в линии, нокаутной по гену *ADAMTS1* ($18,6 \pm 0,6$ и $14,6 \pm 0,4$ фокусов на клетку, соответственно), по сравнению с исходной линией HeLa ($30,6 \pm 0,7$ и $21,9 \pm 0,5$ фокусов на клетку, соответственно). Эффективность

исчезновения фокусов γ H2AX к 48 ч после облучения по сравнению с 2 ч после облучения в нокаутной линии по гену *WHSC1* составила 104,41 %, в нокаутной линии по гену *RBFOX2* – 102,88 %, в нокаутной линии по гену *THBS1* – 103,73 %, в нокаутной линии по гену *ADAMTS1* – 106,18 %, в исходной линии – 102,40 %. Эффективность исчезновения фокусов 53BP1 к 48 ч после облучения по сравнению с 2 ч после облучения в нокаутной линии по гену *WHSC1* составила 90,04 %, в нокаутной линии по гену *RBFOX2* – 108,34 %, в нокаутной линии по гену *THBS1* – 120,51 %, в нокаутной линии по гену *ADAMTS* – 87,57 %, в исходной линии – 113,22 %.

Выявленное влияние нокаута исследованных генов на эффективность репарации ДНК указывает на участие их продуктов в радиационно-индуцированном ответе. Кроме того, ранее, нами были выявлены отрицательные корреляции между уровнем экспрессии гена *ADAMTS1* и радиочувствительностью (в терминах радиационно-индуцированной частоты микроядер) и положительная корреляция между уровнем экспрессии гена *THBS1* и радиочувствительностью. Таким образом, полученные результаты подтверждают предположение об ассоциации высокой экспрессии гена *THBS1* с повышенной радиочувствительностью, и высокой экспрессии гена *ADAMTS1* с радиорезистентностью соматических клеток человека.

Анализ ПЦР в реальном времени не выявил существенных изменений экспрессии генов в нокаутных линиях. Исключение составил ген *RBFOX2*, экспрессия которого была повышена в линии, нокаутной по гену *ADAMTS1*, в 5,5 раз, а в линии, нокаутной по гену *THBS1*, в 3 раза, по сравнению с исходной линией Hela ($p=0,018$ и $p=0,05$, соответственно). Таким образом, мутации, внесенные с помощью системы CRISPR/Cas9, не привели к подавлению экспрессии генов *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2*. Это объяснимо, так как они не затрагивали промоторы генов. Нокаут генов *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2*, как и предполагалось, привел к изменению радиочувствительности клеточных линий. Выявленное влияние нокаута исследованных генов на радиочувствительность клеток указывает на участие их продуктов в формировании фокусов γ H2AX и 53BP1 и репарации двунитевых разрывов ДНК.

Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ № 16-34-50178.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belyaev, I. Y. (2010). Radiation-induced DNA repair foci: spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, no. 704(1), pp. 132-141.
2. Sharma, A., Singh, K., & Almasan, A. (2012). Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol.*, no. 920, pp. 613-626.

**THE EFFECT OF HIGH CONCENTRATION OF MOLIBDENIUM AND ZINC ON THE GROWTH OF
THE STRAIN THERMODESULFOVIBRIO SP. V2 FROM THE DEEP TERRESTRIAL BIOSPHERE**

K.M. Klimova

Scientific Supervisor: PhD Y. A. Frank

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

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

**ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ МОЛИБДЕНА И ЦИНКА НА РОСТ ШТАММА
THERMODESULFOVIBRIO SP. V2 ИЗ ГЛУБИННОЙ БИОСФЕРЫ**

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

Аннотация. В свете увеличения темпов развития нефте-, газо-, горнодобывающей и перерабатывающей промышленности тяжелые металлы стали занимать особое место среди загрязняющих веществ по масштабам и воздействию на биологические объекты. Отходы производств, отвалы бедных руд, шлаки и шламы металлургического производства, а также промышленные стоки представляют с каждым годом всё большую опасность. Вследствие этого, актуальным становятся изучение методов очистки воды от тяжелых металлов, в том числе биоремедиации. Целью исследования является определение влияния ионов тяжелых металлов на рост клеточной биомассы штамма термофильных сульфатредуцирующих бактерий *Thermodesulfovibrio sp. V2* взятых из глубинной биосферы. Найдены предельные концентрации, при которых возможен рост данного штамма для молибдена и цинка, а также построены кривые роста для обоих металлов.

Introduction. The application of biotechnology in water purification is not new. In order to treat copper-containing wastewater effectively using sulfate reducing bacteria (SRB), iron (Fe^0) was added to enhance the activity of SRB. Mine water with high concentrations of protons and metals is formed in the course of biological and chemical oxidation of residual metal sulfides. Microbial sulfidogenesis plays an important part in natural self-purification of mine wastes. SRB produce considerable amounts of sulfide, precipitate metals as sulfides, and increase pH due to proton consumption. This process is used in biotechnologies for treatment of metal contaminated water in bioreactors [1]. Industrial wastewater, such as wastewater originating from mining and metallurgical industries, is typically characterized by a significant content of sulphate and soluble metals, such as Fe, Zn, Cu, Ni, Pb and Cd. Biological treatment of such wastewater, based on SRB, is a viable option due to lower cost and better sludge qualities compared to conventional chemical treatment [2]. Removal of sulphates by chemical treatment is very costly, and therefore the biological method of sulphate reduction in wastewater and sludge can be very effective and economically viable.

SRB are commonly found in sediments and groundwater, especially in the vicinity of organic pollutants. Their effect on the ecosystem is limited to anaerobic conditions, the activity of these microorganisms conditioned by supply of

organic substrates and sulphates depending mainly on the quantitative relationship between organic contaminants are prone to degradation in the process of metabolism, and sulphates (or sulfites, tiosulphites) reduced to hydrogen sulphide or sulphide [3]. Due to these properties, these bacteria are used in wastewater and sludge treatment, industrial waste treatment, bioremediation of soil, and in other activities used in the environmental protection of the environment.

Materials and Methods. Groundwater was sampled from a deep artesian borehole, drilled in 1957. The borehole is designated 5^{kp} and is located near the Chazhemto village in the Tomsk region (concentration of Mo and Zn shown in Table 1 was taken from [4]). Samples were stored in headspace-free bottles until analyzing. Enrichment cultures were established from positive most probable number (MPN) series in lactate-sulfate medium prepared from the wastewater samples. The medium contained (per liter) 1 g NaCl, 0,4 g MgCl₂·6H₂O, 0,15 g CaCl₂·2H₂O, 4,0 g Na₂SO₄, 0,25 g NH₄Cl, 0,2 g KH₂PO₄, 0,5 g KCl, 1 ml trace element solution, 1 ml vitamin solution, and 1 ml selenite-tungstate solution (Widdel and Bak 1992). The medium was supplemented with 1,6 ml of 50% (5,7 M) lactic acid solution. *Thermodesulfovibrio* sp. V2 was grown with lactate as electron donor. The initial pH was adjusted to 7,0-7,2 with NaHCO₃ solution. Sulfide, added as Na₂S·9H₂O, was used as a reducing agent for enrichment and stock cultures. During inoculation Zn²⁺ was added as ZnSO₄·7H₂O to a final concentration of 10, 25, 50, 75 and 100 mg/liter. Mo²⁺ was added as Na₂MoO₃ to a final concentration of 10, 30, 40, 50, 60, 70, 75 mg/liter. Iron paper clips were placed in culture tubes as a source of Fe²⁺. The sealed culture tubes were headspace-free and incubated under static dark conditions at 65 °C. Observation of cells using light microscopy was also routinely used to determine the growth of SRB. In the growth medium the lag period was 7-9 days for zinc and molybdenum.

Results. The results have shown that the growth of isolate *Thermodesulfovibrio* sp. V2 could survive and grow in the presence of molybdenum and zinc. For both metals maximum concentrations of molybdenum and zinc permissible to growth in the liquid medium 75 and 100 mg/liter for isolate *Thermodesulfovibrio* sp. V2, respectively were determined. The concentration of metal ions, in which the growth is possible, is much higher than in the borehole 5^{kp} (Table 1).

Table 1

The metal content in the borehole 5^{kp} and in the Widdel medium

Ion of heavy metal	The metal content in the borehole 5 ^{kp} (mg / dm ³)	The metal content in the Widdel medium (mg / dm ³)
Mo ²⁺	0,21	75
Zn ²⁺	0,05-0,06	100

The growth rate of strain V2 was 0,53×10⁶ cells/mL and 1,13×10⁶ cells/mL when the initial molybdenum and zinc concentration in culture medium was 10 mg/liter, respectively.

Molibdenium at 30 mg/liter in the growth medium decreased the growth rate to 0,21×10⁶ cells/mL. Further increase in molibdenium concentration in V2 cultures was gradual and the maximum number of cells in molybdenum was observed for concentration of 60 mg/liter, 0,49×10⁶ cells/mL. The number of cells in the final concentration of Mo was 0,14×10⁶ cells/mL.

The isolate was resistant to zinc more than to molibdenium. At first the growth increased from 10 to 50 mg/liter. The maximum number of cells in Zn was observed for concentration of 50 mg/liter, 3,39×10⁶ cells/mL. At a

concentration of 60 to 100 ml/liter the growth was abruptly reduced. The number of cells in the final concentration of Zn was $0,11 \times 10^6$ cells/mL (Fig. 1).

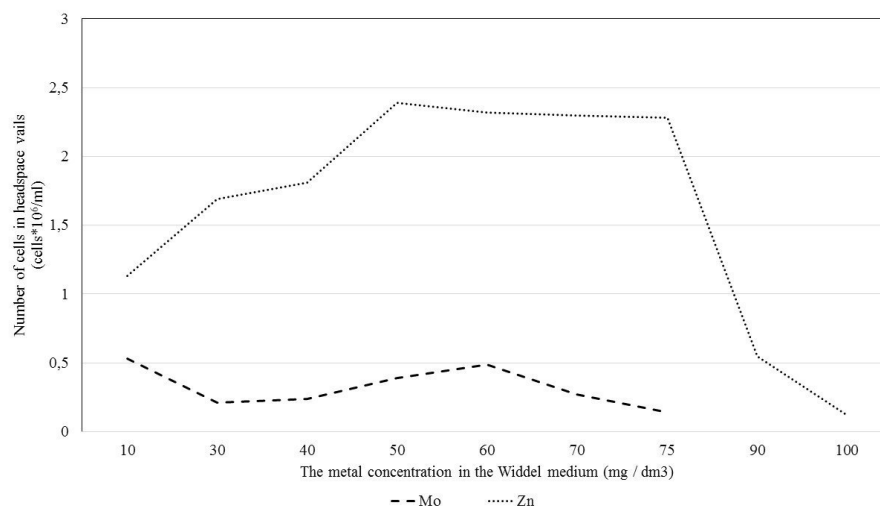


Fig. 1. The effect of molybdenum and zinc on the growth of the strain *Thermodesulfovibrio* sp. V2

Conclusion. Molibdenium and zinc pollution is not uncommon in mine waters and metallurgical effluents. Zn-sulfide formation is important in zinc-polluted environments, because it represents biologically unavailable form of the potentially toxic metal.

The study was partially supported by the grant from the Russian Science Foundation (RNF) №14-14-00427.

REFERENCES

1. Jong T., Parry D.L. (2003) Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Res.*, no. 37, pp. 3379-3389.
2. Kaksonen A. H., Puhakka J. A. (2007) Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. *Engineering in Life Sciences*, no. 7(6), pp. 4164.
3. Wawrzak D. (2013) Microbiological Reduction of Sulfates to Sulphides Used in Dairy Wastewater Treatment. *Journal of the Polish Mineral Engineering Society*, no. 2, pp. 109–111.
4. Levitsky E.F., Adilova V.B. (2002) Resort - recreational potential of Western Siberia, Tomsk.

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ ПРИ
ПОВТОРНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ СЕЗОННЫМИ ШТАММАМИ
ВИРУСА ГРИППА ТИПА А И В**

А.Ю. Кондаурова

Научный руководитель: к.б.н. А.В. Ковнер

Новосибирский государственный университет, Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090

ФБГНУ НИИ Экспериментальной и клинической медицины,

Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, 630117

E-mail: anakonda1894@rambler.ru

**PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN THE INTERNAL ORGANS OF MICE DURING
THE REPEATED INFECTION WITH SEASONAL INFLUENZA A AND B VIRUS STRAINS**

A.Yu. Kondaurova

Scientific Supervisor: Ph.D. A.V. Kovner

Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, ul. Pirogova, 2, 630090

Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine,

Russia, Novosibirsk, Timakova str, 2, 630117

E-mail: anakonda1894@rambler.ru

Abstract. *The investigation of the effect of repeated infection with seasonal influenza A and B virus strains on the formation of structural changes in the organs of infected animals was studied.*

Актуальность. Вирус гриппа один из самых распространенных патогенов человека. За период одного сезона появляются новые штаммы вируса [1]. Ежегодно от сезонных эпидемий страдает 25-30% взрослого населения и 30-40% детей [2]. Самыми распространенными вирусами гриппа, во время сезонных эпидемий являются А/Н1N1, А/Н3N2 и В/Victoria, В/Yamagata [3]. Актуально изучение влияния повторного инфицирования сезонными штаммами вируса гриппа типа А и В на формирование структурных изменений в органах экспериментально инфицированных животных.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 100 мышах-самцах линии BALB/c, 3-х месячного возраста с массой тела 20-25 г. Инфекцию мышей проводили интраназально с соответствующим штаммом вируса гриппа. Животных разделили на две группы: первую (контрольную) и вторую. 60 мышей были инфицированы вирусами сезонного гриппа А (H1N1) и В (Yamagato и Victoria).

Инфицирование животных и выведение из эксперимента осуществляли по следующей схеме:

- 1-е сутки - инфицирование вирусом В/Novosibirsk/OK/2014/, 21-е сутки – выведение мышей из эксперимента и изъятие внутренних органов;
- 21-е сутки – инфицирование вирусом А/Novosibirsk/KSH/2011(H1N1), 42-е сутки - выведение мышей из эксперимента и изъятие внутренних органов;
- 42-е сутки - инфицирование вирусом В/Novosibirsk/36/2008(Vict lin), 63-е сутки - выведение мышей из эксперимента и изъятие внутренних органов;

Выведение животных из эксперимента осуществляли путем декапитации под эфирным наркозом. Объектами исследования были легкие, почки, печень и мозг. Пробы органов были подвергнуты стандартной гистологической обработке. Гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином Ван-Гисона. Для визуализации присутствия вируса в ткани проводили иммуногистохимическое окрашивание антителами вирусов гриппа А и В. Использовалось следующее оборудование: станция для гистологической проводки STP-120 (ThermoScientific, США), станция для заливки в парафин EC-350 (ThermoScientific, США), микротом Microm (ThermoScientific, США) и микроскоп AxioImager (Carl Zeiss, Германия). Изготавливали гистологические срезы толщиной 3,5 мкм.

Результаты и их обсуждение. На 21-е сутки после инфицирования вирусом гриппа В/Novosibirsk/ok/2014 (yamagatalin) в исследуемых органах выявили следующие патоморфологические изменения: в легких – участки периваскулярных кровоизлияний, деструктивные изменения (ателектазы) с развитием воспалительного инфильтрата преимущественно лимфоцитарно-макрофагального характера и формирование единичных локусов микронекроза, а также очаговый периваскулярный и перибронхиальный фиброз. В почках мышей визуализировали полнокровие капилляров клубочков с увеличением их размеров, по сравнению с показателем контроля в 2 раза. Это сопровождалось развитием умеренного отека, формированием кровоизлияний. Выявленные гемоциркуляторные нарушения в сосудах почек экспериментально инфицированных мышей обусловили формирование ишемических деструктивных изменений в эпителии канальцев-участков дистрофии канальцев и локусов некроза. В печени наблюдали очаговое полнокровие сосудов среднего и мелкого калибра с формированием единичных тромбов, периваскулярные очаги кровоизлияний и воспалительные инфильтраты (лимфоцитарно-макрофагального характера). В головном мозге инфицированных животных выявили участки периваскулярного и перицеллюлярного отека с формированием периваскулярного клеточного инфильтрата (лимфоцитарного генеза). Инфицирование вирусом гриппа В/Novosibirsk/ok/2014 (yamagatalin) сопровождалось полнокровием сосудов, преимущественно микроциркуляторного русла головного мозга, с формированием тромбов. Общее количество сосудов головного мозга у инфицированных животных было большим в 1,5 раза по сравнению с контролем. Можно предположить, что инфекция повлекла за собой увеличение количества полнокровных и тромбированных сосудов, что, в процессе регенерации привело к увеличению общего количества сосудов.

После последующего инфицирования мышей вирусом гриппа А/Novosibirsk/ksh/2011(H1N1) было выявлено прогрессирование патоморфологических изменений в органах. В легких животных фиксировали тенденцию к увеличению объемной плотности кровоизлияний, деструкции и интерстициального отека; достоверное увеличение объемной плотности воспалительного инфильтрата и фиброзной ткани по сравнению с предыдущим инфицированием в 2 и 2,1 раза соответственно. Это может говорить о том, что прогрессирующее воспаление ограничивает очаг инфекции, но повторное инфицирование провоцирует воспалительную деструкцию тканей. В почках мышей, при инфицировании вирусом гриппа А, по сравнению с вирусом гриппа В, отмечено достоверное увеличение объемной плотности клубочков в 1,2 раза, достоверное уменьшение объемной плотности дистрофии эпителия канальцев в 1,3 раза с одновременным увеличением показателя объемной плотности очагов микронекроза в 2,9 раза. В печени животных так же фиксировали прогрессирование патоморфологических изменений, что сопровождалось пролиферацией эпителия желчных протоков. В

головном мозге мышей при данном инфицировании вирусом гриппа А выявили достоверное увеличение объемной плотности очагов микронекроза и отека вещества головного мозга, относительно первого инфицирования, в 3,3 и 3,7 раза соответственно, что было сопряжено с увеличением количества полнокровных и тромбированных сосудов с развитием гипоксии.

После третьего инфицирования вирусом гриппа В/Novosibirsk/36/2008 (victorialin.) в легких мышей по сравнению с предыдущим инфицированием достоверно увеличивалась объемная плотность деструктивных изменений в 1,3 раза, что проявлялось увеличением объемной плотности зон отека, воспалительной инфильтрации и фиброзной ткани в 2,2, 1,8 и 1,4 раза соответственно. В почках инфицированных животных отмечали увеличение объемной плотности клубочков в 1,3 раза по сравнению с предыдущим инфицированием, что сопровождалось увеличением объемной плотности клеточного воспалительного инфильтрата. При этом объемная плотность очагов дистрофии эпителия канальцев и очагов некроза фактически не изменилась. Показатели количества полнокровных сосудов и объемной плотности зон кровоизлияний приданной инфицированию были максимальными в сравнении с показателями предыдущих этапов исследования. В печени мышей отмечали увеличение объемной плотности очагов дистрофии гепатоцитов и увеличение количества клеток Купфера. В головном мозге отмечали увеличение показателей патоморфологических признаков отечно-геморрагического синдрома. Выявленные гемоциркуляторные нарушения в сосудах головного мозга сопровождались увеличением формирования клеточного воспалительного инфильтрата, преимущественно лимфоцитарного характера, в корковом веществе с формированием мелкоочаговых периваскулярных инфильтратов.

Выводы. Выявленные патоморфологические изменения в органах экспериментальных животных при многократном инфицировании различными сезонными штаммами вируса гриппа А и В, в значительной степени обусловлены нарастающими гемоциркуляторными нарушениями, связанными с цитотоксическим влиянием вируса гриппа А и В на клетки эндотелия сосудов, преимущественно мелкого и среднего калибров. Повреждение эндотелиальной выстилки сопровождалось формированием морфологических признаков геморрагического синдрома в виде выраженного полнокровия сосудов, с тенденцией к тромбозообразованию, что в свою очередь, обуславливало развитие отечно-деструктивных изменений в органах. При этом и степень выраженности гемоциркуляторных нарушений, и степень формирующейся деструкции тканей органов экспериментальных животных прямо пропорциональна увеличению количеству инфицирований.

Повторное инфицирование мышей разными штаммами сезонного вируса гриппа типа А и В проявляется в органах сходными структурными изменениями вне зависимости от штамма. Различная же степень их проявления, возможно, связана с множественностью инфицирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neumann, G., Noda, T., Kawaoka, Y., (2009, June 18) Emergence And Pandemic Potential Of Swine-origin H1N1 Influenza Virus. *Nature*, no (459), pp. 931–939.
2. World Health Organization. Influenza: Overview. (2003).
3. Jackson D., Elderfield, R. A., Barclay, W. S. (2011) Molecular Studies Of Influenza B Virus In The Reverse Genetics Era. *Journal Of General Virology*, no. (92), pp. 1–17.

**КАРИОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ У
ЛЮДЕЙ, СТРАДАЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В ОБЛАСТИ ОТОРИНОЛАРИНГОЛОГИИ**

В.Н. Котова, А.А. Гороховский, М.С. Ханьжин

Научный руководитель: проф., д.б.н. Н.Н. Ильинских

Сибирский государственный медицинский университет,

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

E-mail: viokot@mail.ru

**KARYOPATOLOGIC CHANGES IN BUCCAL EPITHELIUM CELLS OF THE PEOPLE, WHO
SUFFER DISEASES FROM OTORHINOLARYNGOLOGIC SPHERE**

V.N.Kotova, A.A. Gorokhovskiy, M.S. Hanjin

Scientific Supervisor: Prof., Dr. N.N. Ilinskikh

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

E-mail: viokot@mail.ru

Abstract. *This work consisted in the study of karyopatologic changes in buccal epithelium of the people, who suffer different otolaryngologic diseases: chronic tonsillitis, acute nasopharyngitis, chronic vasomotor rhinitis and chronic rhinosinusitis. The results of the karyopatologic study in buccal epithelium of the patients with ENT diseases were compared with the corresponding figures of the control group of people who do not suffer these diseases. The experimental and control group consisted of 10 persons. No less than 1000 buccal epithelium cells were analyzed with every drug, made by pap smear. The buccal epitheliocytus comparative analysis of the healthy people and people who suffer otolaryngologic diseases showed the significant rise of cells with karyolysis in epithelium of the diseased ($38,8 \pm 7,5$ versus $7,4 \pm 1,2\%$ in control, at $p < 0,01$) and with karyopyknosis ($2,8 \pm 0,4$ versus $1,6 \pm 0,4\%$ in control, at $p > 0,05$). Frequency of other karyopatologies: karyorhexis of cells with binuclear kernels with microkernels did not have statistically significant differences with control level. Both processes: karyolysis and karyopyknosis are different types of cell apoptosis which is one of the mechanisms to remove genetically defected cells from organism. The same changes (karyolysis) were registered in the studies of other scientists dedicated to the patients suffered chronic vasomotor rhinitis, chronic rhinosinusitis and acute nasopharyngitis.*

Введение. В ранее проведённых исследованиях, начиная с 1961 года, благодаря таким авторам, как В. Hamper, S.A. Ellison, P. Aula и многим другими стало известно, что вирусы и бактерии как физические и химические мутагены способны вызывать в соматических клетках организма цитогенетические изменения [2]. О нарушении ядерного аппарата клетки может свидетельствовать изменение структуры интерфазного ядра, что происходит из-за патологического течения митоза. Наиболее быстрые изменения происходят в иммунокомпетентных клетках организма, потому что при попадании инфекционного агента именно эти клетки поражаются в первую очередь, однако в рамках нашей работы проводились исследования на клетках буккального эпителия, который выполняет барьерную функцию защиты от попадания в организм инфекционного агента. На данный момент исследований, показывающих связь между наличием карипатологических изменений в слизистой

буккального эпителия полости рта человека и отоларингологическим заболеванием, вызванным инфекционными агентами, в доступной литературе нам не известно.

Данная работа посвящена изучению частоты карипатологических изменений в буккальном эпителии у больных инфекционными ЛОР-заболеваниями (хронический тонзиллит, острый назофарингит, хронический вазомоторный ринит, смешенная тугоухость, лакунарная и фолликулярная ангины, различные синуситы и хронический гайморит), находящимися на излечении в ЛОР-отделении 3-й городской клинической больницы г. Томска. Полученные данные сравнивались с тем же количеством здоровых людей.

Материалы и методы исследования. Было обследовано 10 больных людей с инфекционными заболеваниями в области оториноларингологии. Из вышеуказанного числа обследованных было 2 человека с хроническим вазомоторным ринитом, 2 человека с острым назофарингитом и хроническим тонзиллитом, а также 6 человек имеющих различные заболевания: фолликулярная ангина, лакунарная ангина, хронический вазомоторный риносинусит, хронический риносинусит, острый синусит, хронический гайморит [4]. Забор биологического материала производился в момент проявления симптомов болезни, сразу после обращения больного в медицинское учреждение. В составе контрольной группы выступили жители города Томска, не имеющие ЛОР-заболеваний инфекционной природы. Предварительно у каждого обследованного было взято информированное согласие на проведение цитогенетического исследования. Препараты были изготовлены методом мазка, зафиксированного в жидкости Карнуа и окрашенного по методу Романовского-Гимзе. На каждом полученном мазке просматривалось не менее 1000 эпителиоцитов. Исследование велось под микроскопом Carl Zeiss Primo Star с использованием иммерсионного масла.

Двухядерными клетками считались клетки с ядрами, лежащими отдельно друг от друга или наслаивающимися друг на друга, при этом исключалось наложение цитоплазмы. Микроядра в клетках буккального эпителия оценивались, как образования, лежащие отдельно от ядра, имеющие такую же окраску, как и ядро, размером в 1/3 самого ядра [1, 3]. Кариопикноз или пикноз – это явление, при котором, клетка имеет, из-за сильной гетерохроматизации, наиболее интенсивно окрашенное ядро, сравнительно меньшего размера с чётким контуром. Кариорексис – это процесс, морфологически представленный распадом ядра на несколько фрагментов. Лизированные клетки – клетки, не имеющие чётко оформленного ядра из-за расщеплённых в нём нуклеиновых кислот, отвечающих за восприятие красителя.

Расчет произведен по t критерию Стьюдента на основании констант для средних ошибок по формуле Е.В. Монцевичюте-Эрингене. Проведенное нами тестирование закона распределения при помощи критерии Колмогорова-Смирнова не выявило отличий от нормального. Различия сравниваемых результатов ($X \pm m$, где X – выборочное среднее арифметическое, m – ошибка среднего арифметического) считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. В ходе исследования было выявлено, что число клеток с карипатологическими поражениями ядра клеток буккального эпителия у людей, страдающих инфекционными заболеваниями ЛОР-органов, превышает более чем в 3,0 раза соответствующий показатель у здоровых людей ($47,3 \pm 7,95$ и $14,4 \pm 1,55$ % в контроле, при $p < 0,01$). Главным образом, наблюдается большое количество клеток с кариопикнозом и кариолизисом, начальным и конечным этапами некробиоза клеток. Хорошо выражено

возрастание кариолизиса у больных хроническим вазомоторным ринитом, хроническим риносинуситом и острым назофарингитом. Самые высокие показатели кариопикноза у больных фолликулярной ангиной, острым назофарингитом, хроническим вазомоторным ринитом. Данные находятся выше среднего уровня кариолизиса и кариопикноза соответственно. Таким образом, возрастание патологически измененных клеток в обоих случаях отмечается у больных, страдающих хроническим вазомоторным ринитом и острым назофарингитом. Отдельно отмечается возрастание кариолизиса у больного с хроническим риносинуситом и кариопикноза у пациента с фолликулярной ангиной. Выявлено статистически значимое повышение числа клеток с абберациями типа кариолизис ($38,8 \pm 7,52$ и $7,4 \pm 1,22\%$ при $p < 0,01$), а так же незначительное повышение числа клеток с патологиями типа кариопикноз ($2,8 \pm 0,41$ против $1,6 \pm 0,38\%$ при $p > 0,05$) у больных ЛОР-заболеваниями относительно здоровых людей (табл.1). Низкую значимость повышения числа эпителиоцитов с кариопикнозом можно объяснить различными факторами: стадией болезни, высокой иммунной активностью организма, быстрым устранением кариопатологически измененных эпителиоцитов.

Таблица 1

Частота патологически измененных клеток буккального эпителия здоровых людей и людей, страдающих ЛОР заболеваниями

Типы патологий	Контроль	Опыт	p
Кариопикноз	$1,6 \pm 0,38$	$2,8 \pm 0,41$	$p > 0,05$
Кариорексис	$1,4 \pm 0,34$	$1,8 \pm 0,62$	$p > 0,05$
Кариолизис	$7,4 \pm 1,22$	$38,8 \pm 7,52$	$p < 0,01$
Двухядерность	$3,3 \pm 0,42$	$3,2 \pm 0,65$	$p > 0,05$
Микроядра	$0,7 \pm 0,18$	$0,7 \pm 0,14$	$p > 0,05$

Выводы. Таким образом полученные данные свидетельствуют, что при ЛОР- заболеваниях, вызванных инфекционными агентами, наблюдается значимое увеличение числа клеток с кариолизисом, а также сравнительно небольшое повышение числа клеток с кариопикнозом в буккальном эпителии полости рта человека. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что инфекционные агенты способны вызывать кариопатологическое воздействие не только на иммунокомпетентные клетки крови, но и на другие соматические клетки человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность / Под ред. Н.Н. Ильинских. – Томск: Изд-во ТГУ, 1991. – 272 с.
2. Инфекционная кариопатология / Под ред. Н.Н. Ильинских. – Томск: Изд-во ТГУ, 2005. – 168 с.
3. Микронуклеогенез и цитогенетическая нестабильность / Под. ред. Н.Н. Ильинских – Томск: Крокус, 2011. – 285 с.
4. Болезни уха, горла и носа / Под ред. В.Т. Пальчуна. – М.: Медицина, 1991. – 240 с.

**ПОВЫШЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА АСТРОЦИТОВ В МОДЕЛИ ТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС**

М.С. Кудабоева

Научный руководитель: доцент, д.б.н. М.Ю. Ходанович

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

E-mail: kmsra08@gmail.com

**INCREASE OF ASTROCYTES NUMBER IN GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA IN
RATS**

M.S. Kudabaeva

Scientific Supervisor: Associate Prof., Dr. M. Yu. Khodanovich

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

E-mail: kmsra08@gmail.com

Abstract. *Astrocytes are the most abundant cell class in the CNS. Astrocytic therapies have huge potential for neuronal repair after stroke. The most number of brain stroke studies address to clear damage of neurons. Modern studies turn to usage of morphological and functional changes in astroglial cells after stroke in regenerative medicine. Our study is focused on the changes of numbers of astrocytes in hippocampus (where new glia divide) after brain ischemia. Ischemia was modeled by occlusion of tr. brachiocephalicus, a. subclavia sin., a. carotis communis sin. Astrocytes were determined using immunohistochemical labeling with anti GFAP antibody. We found out that number of astrocytes increased in 10th and 30th days after stroke in CA1, CA2 fields, granular layer of dentate gyrus (GrDG) and hilus. Morphology of astrocytes became reactive in these regions. Our results reveal substantial long-term inflammation in hippocampus region after global ischemia in rats.*

Введение. Инсульт является одной из лидирующих причин смертности и инвалидизации населения по всему миру. Устранение последствий данного заболевания является важной задачей для медицины. Современные исследования по созданию лекарств, для лечения инсульта все чаще становятся, направлены на поддержку и регуляцию астроцитов при патологии. Астроглия играет важную роль в регуляции постишемического воспаления. В данном исследовании было изучено влияние тотальной ишемии головного мозга (ТИГМ) на реактивацию астроцитов.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на 20 половозрелых крысах-самцах линии вистар (массой 250-300 г). Животные содержались в стандартных условиях вивария во время исследования. Моделирование тотальной ишемии проводилось путем хирургической окклюзии сосудов (левой общей сонной артерии, левой подключичной артерии, брахицефального ствола) с использованием лигатуры [1]. Ишемический эпизод длился 7 минут. После снятия лигатур наступала реперфузия сосудов. Во время операции использовался хлоралгидратный наркоз с искусственной вентиляцией легких, при транскардиальной перфузии – эфирный. Отслеживание изменений производилось в нескольких временных точках. Для этого животные делились на 4 группы: спустя 10 суток после ишемии - «Контроль-1», «Ишемия-1», спустя 30 суток - «Контроль-2», «Ишемия-2». Контрольным группам

проводились те же манипуляции за исключением затягивания лигатур и создания ишемического эпизода. Фиксация тканей проводилась при помощи 4% раствора формалина. Для криопротекции изъятый мозг помещался в 10% раствор сахарозы на 24 часа, после в 20% раствор сахарозы еще на 24 часа. После криопротекции ткани замораживались в парах азота и помещались для хранения в морозильную камеру на температуру -80°C . Срезы замороженных тканей получали с использованием криотома (*Thermo Scientific HM 525, Germany*) при ширине шага 10 мкм. Иммуногистохимический анализ тканей проводился с использованием специфических антител: к *GFAP* (*Rabbit anti GFAP, Alexa Flour, USA*) для оценки реактивации глии. Для осуществления флуоресцентной съемки использовался маркер к антителу: *Alexa Flour®488 Donkey anti Rabbit*. В ходе анализа подсчитывалось количество клеток в регионах гиппокампа: поля *CA1*, *CA2*, слои, *granular layer of dentate gyrus (GrDG)*, *hilus*. Анализ данных в программе STATISTICA 10 проводился с использованием t-критерия для несвязанных выборок.

Результаты. Статистический анализ данных показал увеличение количества астроцитов у группы «Ишемия-1» в зоне *CA2*, *hilus* ($p<0,01$), *CA1*, *GrDG* ($p<0,05$), по сравнению с группой «Контроль-1». Реактивная пролиферация астроцитов вокруг поврежденных нейронов усилилась более чем в два раза в поле *CA1*, *CA2*. Анатомически поля *CA1*, *CA2* обладают высокой плотностью нейронов и небольшим количеством глии. Миграция и пролиферация глии в этой зоне свидетельствует о наличии воспаления. Наименее сильные изменения на 10 сутки наблюдались в слое *GrDG*, где ишемическому воздействию подвергаются не только взрослые астроциты, но и радиальная глия, экспрессирующая *GFAP* (Рис.1). Данные изменения свидетельствует об индукции деления стволовых клеток.

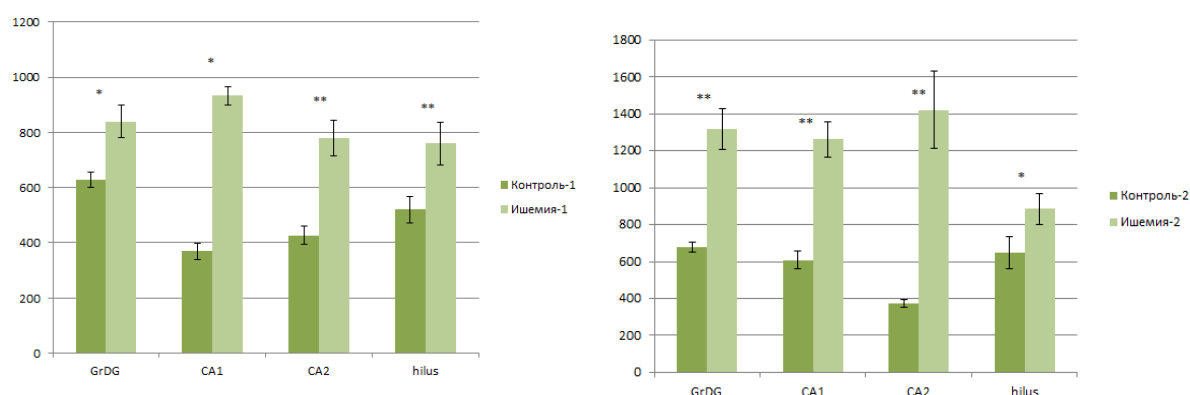


Рис. 1. Увеличение количества астроцитов в слоях гиппокампа после ишемического поражения на 10 и 30 сутки. Указано количество клеток на мм^2 . Представлены средние по группе со стандартной ошибкой средней. Статистические различия отмечены символами: * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$.

Различия между группами усиливаются на 30 сутки. Наблюдается значительное повышение количества астроцитов в слоях *GrDG*, *CA1*, *CA2* ($p<0,01$), *hilus* ($p<0,05$) в группе «Ишемия-2» по сравнению с группой «Контроль-2». Количество астроцитов в поле *CA2* превышает контрольные показатели более чем в 3 раза. Усиление различий по сравнению с контролем в слое *GrDG* говорит, о наличии пика деления стволовых клеток в гранулярном слое в период около 30 суток после ишемии.

Астроциты сохраняли морфологию характерную для состояния реактивации в обеих ишемических группах, о чем свидетельствует характерное «набухание» клеток, увеличение ветвистости и удлинение отростков, идентифицируемых по усилению экспрессии и распределению *GFAP* (Рис. 2). Такая морфология сохраняется во всех временных точках исследования после ишемии.

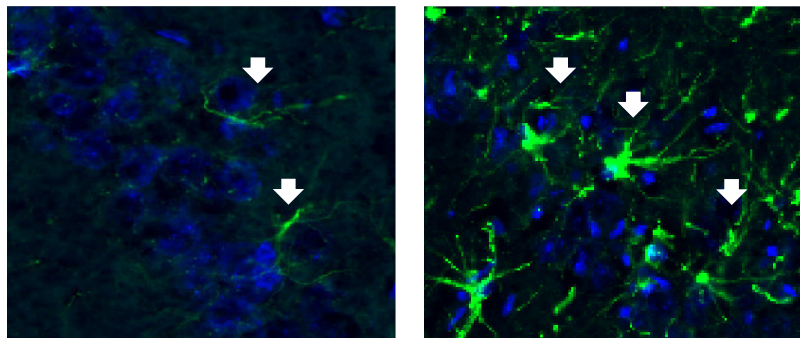


Рис. 2. Изменение количества астроцитов в поле CA1 гиппокампа крыс. Слева представлена группа «Контроль-1», справа показана группа «Ишемия - 1». В синий цвет окрашены ядра клеток (DAPI), зеленым окрашены отростки астроцитов (GFAP). Размер изображения: 100 мкм. Увеличение $\times 20$.

Заключение. Пирамидальные нейроны поля CA1 наиболее чувствительны к ишемическому воздействию, снижение кровоснабжения приводит к отмиранию нейронов данного слоя. Поврежденные клетки поля CA1 и исходящие от них сигналы индуцируют реактивацию астроглии. Наши данные свидетельствуют о запуске репаративных процессов, приводящих к ограничению очага воспаления после ишемии. Воспалительные процессы усиливаются в течение месяца после воздействия ТИГМ. Реактивация астроглии изменяет ее функции по поддержки метаболизма нейронов. Исходя из наших данных, доказывающих сохранение реактивации глии спустя месяц после ишемического эпизода, можно предположить, что постишемическое воспаление обладает патогенным потенциалом по отношению к здоровым нейронам, прилегающим к слою CA1. Постнатальное деление стволовых клеток сохраняется в зоне GrDG гиппокампа и является физиологически значимым процессом. Ряд ученых высказывает предположение, что гибель нейронов является индуктором пролиферации стволовых клеток, которые могут дифференцироваться в нейрональные прогениторы [2]. Наши данные доказывают, что ишемия является фактором стимулирующим деление *GFAP*-положительных стволовых клеток.

Работа поддержана грантом РНФ (проект № 14-45-00040).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pecna M., Pecny M. (2014) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol. Rev.*, Vol. 94, pp. 1077–1098.
2. Chernysheva G. A., Smolyakova V. I., Osipenko A. N., & Plotnikov M. B. (2014) Evaluation of Survival and Neurological Deficit in Rats in the New Model of Global Transient Cerebral Ischemia. *Bull. Exp. Biol. Med.*, Vol. 158, no. 2, pp. 197–199.

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТА ПОЛИ
(АДФ-РИБОЗО) ПОЛИМЕРАЗЫ 1**

Т.А. Кургина

Научный руководитель: к.х.н. Р.О. Анарбаев

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет

Россия, г.Новосибирск, ул. Пирогова 2, 630090

E-mail: t.a.kurgina@gmail.com

**DEVELOPMENT OF TEST-SYSTEM FOR THE ANALYSIS OF THE POLY (ADP-RIBOSE)
POLYMERASE 1 INHIBITION**

T.A. Kurgina

Scientific Supervisor: Dr. R.O. Anarbaev

Novosibirsk national research state university

Russia, Novosibirsk, Pirogova st., 2, 630090

E-mail: t.a.kurgina@gmail.com

Abstract. *The purpose of our work was to develop a test-system for studies of PARP1 inhibition in vitro. Earlier this test-system has been used to monitor the poly(ADP-ribosil)ation activity of PARP1. This system was tested for the study of the mechanism of PARP1 inhibition in real time. It was shown that this system can be used for investigating the PARP1 inhibition and the screening studies to find new PARP1 inhibitors.*

Введение. Одной из основных клеточных реакций, возникающей при повреждениях ДНК, является поли(АДФ-рибозил)ирование. Это посттрансляционная модификация различных белков, катализируемая ферментом поли(АДФ-рибоза)полимеразой 1 (PARP1). Данный фермент активируется при связывании с повреждением в ДНК, например, однонитевым разрывом. ДНК при этом выступает в роли кофактора. Используя в качестве субстрата NAD⁺, фермент синтезирует поли(АДФ-рибозу). Принято считать, что аутомодификация PARP1 приводит к диссоциации комплекса данного фермента с ДНК за счёт электростатического отталкивания, создаваемого отрицательно заряженным полимером поли(АДФ-рибозы) [1]. PARP1 и его активность важны для эксцизионной репарации оснований, транскрипции, образовании веретена деления, репарации двухнитевых разрывов [2]. Такое обилие функций и ведущая роль в репарации однонитевых разрывов делает данный фермент важной мишенью для создания противораковых препаратов. Терапевтический эффект ингибиторов PARP1 и других компонентов системы репарации основан на предотвращении восстановления ДНК раковых клеток после воздействия химиотерапевтическими агентами или ионизирующим излучением. Ингибиторы PARP1 повышают эффективность действия ДНК-алкилирующих агентов (например, темозоламида) и ингибиторов ДНК-топоизомеразы 1 (например, топотекана), а также ионизирующего излучения [3]. Ингибиторы PARP1 активно используются вместе с другими ДНК-повреждающими противоопухолевыми лекарствами, но могут осуществлять и прямое токсическое действие [4]. Однако, встречается так же и устойчивость опухолей к ингибиторам PARP1 [5].

Результаты клинического применения ингибиторов PARP1 прошлых поколений могут служить основой для продолжения поиска новых соединений, обладающих большей эффективностью. Важными являются и фундаментальные исследования, проясняющие механизмы взаимодействия PARP1 с различными компонентами систем, обеспечивающих стабильность генома. До настоящего времени не существовало методики изучения активности PARP1 в реальном времени, и все существующие методики основаны на определении количества образовавшейся поли(АДФ-рибозы) после остановки реакции. Подобный подход является трудоёмким, связан с большими затратами времени и делает затруднительным анализ механизмов ингибирования. Многие методы предполагают использование радиоактивной метки.

Целью работы являлась апробация представленной ранее тест-системы определения активности PARP1 в реальном времени для изучения ингибиторов данного фермента. Нами изучено *in vitro* действие препарата олапариб - ингибитора PARP1, уже применяемого в клинике [4].

Материалы и методы исследования. В работе использовались: рекомбинантный фермент PARP1, олапариб (Selleckchem) и двухцепочечный олигонуклеотид. Для исследования активности PARP1 использовался метод флуоресцентной спектроскопии. Для этого в качестве кофактора, активирующего PARP1, нами использовался короткий ДНК-дуплекс, содержащий одонитевой разрыв и флуорофор карбоксифлуоресцеин, присоединенный к 3' концу одной из цепей ДНК-дуплекса. Флуоресцентная метка позволяет детектировать активность PARP1 в реальном времени с помощью измерения анизотропии флуоресценции реакционной смеси. Анизотропия возрастает при связывании ДНК с белком. Таким образом, измеряя анизотропию, мы можем наблюдать связывание PARP1 с ДНК и его диссоциацию при поли(АДФ-рибозил)ировании.

С помощью разработанного нами метода мы изучили активность PARP1 на ДНК-дуплексе, содержащем одонитевой разрыв. Варьируя концентрацию фермента, мы определили величину константы диссоциации. Она составила 32 ± 3 нМ. Далее, определив зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации NAD^+ мы рассчитали Константу Михаэлиса ($K_M = 26 \pm 3$ мкМ). Затем данный метод был использован для изучения ингибирования PARP1 с помощью олапариба. Нами было изучено влияние данного препарата на связывание PARP1 с ДНК (рис.1.) и диссоциацию этого комплекса в процессе поли(АДФ-рибозил)ирования (рис.2.).

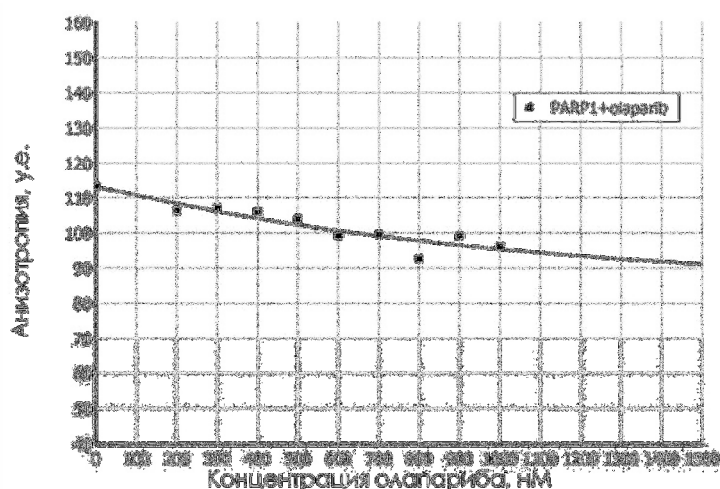


Рис.1. Влияние различных концентраций олапариба на связывание PARP1 с ДНК.

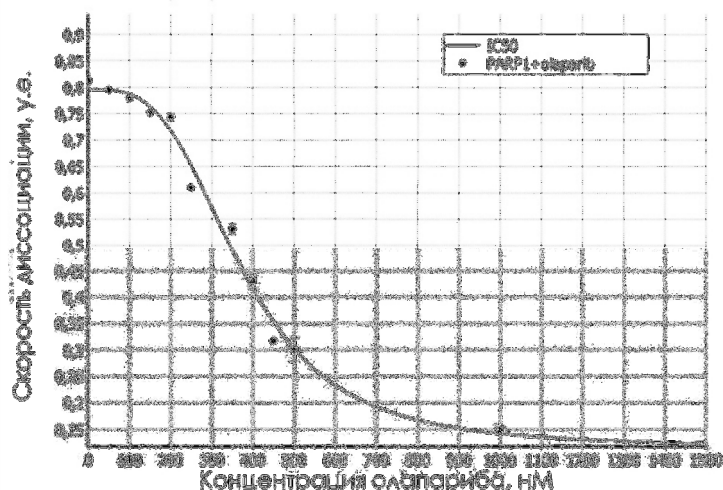


Рис.2. Влияние различных концентраций олапариба на скорость диссоциации PARP1 с ДНК.

Из рисунков видно, что олапариб практически не влияет на связывание PARP1 с ДНК, но значительно ингибирует процесс его диссоциации в процессе синтеза поли(АДФ-рибозы). В наших условиях константа ингибирования IC₅₀ составляет 360 ± 14 нМ.

Выводы. Таким образом, нами показано, что разработанная тест-система для изучения активности PARP1 *in vitro* может применяться для быстрого скрининга ингибиторов данного фермента и изучения механизмов его ингибирования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-24-00038 и программы СО РАН (III.2П.1) проект №1.1.1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindahl T., Satoh M., Poirier G., Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. Trends Biochem Sci, – 1995, N. 20, pp. 405–411.
2. Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 as a key regulator of DNA repair. Mol Biol (Mosk), – 2016, N. 50(4), pp. 655-673.
3. Sonnenblick A. et al. An update on PARP inhibitors-moving to the adjuvant setting. Nat Rev Clin Oncol, – 2015, N. 12, pp. 27–41.
4. Kim G. et al. FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. Clin Cancer Res, , – 2015, N. 21(19), pp. 4257–4261.
5. Fojo T., Bates S. Mechanisms of resistance to PARP inhibitors--three and counting. Cancer Discov, , – 2013, N. 2, pp. 20–23.

**БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ИМПУЛЬСНЫХ ЭЛЕКТРОННЫХ ПУЧКОВ В
ВОДНЫХ СРЕДАХ**

А. А. Курилова, А. В. Полосков

Научный руководитель: профессор, д.т.н. Г. Е. Ремнёв

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

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

E-mail: kaa-3132@mail.ru

BACTERICIDAL ACTIVITY OF PULSED ELECTRON BEAMS IN AQUEOUS MEDIUMS

A. A. Kurilova, A.V. Poloskov

Scientific Supervisor: Prof., Dr. G. E. Remnev

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

E-mail: kaa-3132@mail.ru

Abstract. *The objective of the study is to consider the possibility of applying the pulsed electron beam for neutralize of various groups of microorganisms. The advantages of this method have been shown. The microbial suspension has been irradiated by a pulsed electron beam, and then the effectiveness of the electron beam as a disinfecting agent has been assessed. On the example of some microorganisms, it has been illustrated that the nanosecond electron beam is an effective disinfecting agent for the wastewater treatment.*

Введение. На сегодняшний день все более остро встает проблема обеззараживания сточных вод. Наиболее распространенный метод решения этой проблемы – химическая дезинфекция, которая заключается в хлорировании или в озонировании. Однако вследствие хлорирования в обработанной воде образуются токсичные хлорорганические соединения, а озонирования – биоразлагаемая органика и сложные органические соединения [1]. Таким образом, одной из самых актуальных задач является совершенствование методик обеззараживания сточных вод. Наиболее перспективны безреагентные методы очистки, в частности, обеззараживание воды с использованием непрерывных и импульсных электронных пучков.

Ионизирующее излучение было рекомендовано ФАО / МАГАТЭ / ВОЗ [2, 3] для микробной деkontаминации пищевых продуктов и многих фармацевтических препаратов [4-6], а также для дезинфекции сточных вод [7]. Однако в случае обеззараживания вод воздействием непрерывного ионизирующего излучения, облучение всего объема очищаемой воды приводит к увеличению мощности и габаритов источника излучения. Кроме того, на сегодняшний день результаты исследований свидетельствуют о том, что при использовании сильноточных электронных пучков (СЭП) импульсного характера эффективная стерилизующая доза снижается по отношению к стандартной дозе непрерывного излучения [8]. На основании этого мы можем сделать вывод о перспективности использования импульсного электронного пучка в качестве стерилизующего агента для дезинфекции сточных вод.

Целью данной работы являлось определение эффективности использования импульсного электронного пучка для обезвреживания микроорганизмов.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводились на примере культур *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. Эти культуры были выбраны в качестве представителей различных групп бактерий, обитающих в сточных водах. *E. coli* относится к грамотрицательным, неспорообразующим факультативным анаэробам. Некоторые штаммы могут вызывать пищевые отравления. Кроме желудочно-кишечного тракта млекопитающих, также обитают в почве, воде, продуктах питания. *B. subtilis*, напротив, относится к грамположительным, спорообразующим микроорганизмам, высоко устойчивым ко многим неблагоприятным факторам; обитают в почве и в воде [9].

Для исследований использовались культуры в стационарной фазе роста. По литературным данным, в этой фазе микроорганизмы наиболее устойчивы к воздействию ионизирующего излучения [10]. Чистые культуры микроорганизмов культивировались на ГРМ-агаре в течении 18 – 20 часов при температуре 37°C, после чего готовились микробные взвеси определенной концентрации в соответствии со стандартом мутности бактериальных взвесей (СОП № 1-98, 5 ед.). Концентрация для *E.coli* составила 3×10^8 клеток/мл, а для *B. subtilis* $0,1 \times 10^8$ клеток/мл. Затем бактериальные суспензии в объеме 60 мкл помещались в кюветы и подвергались облучению на импульсном электронном ускорителе (ТЭУ-500). Величина поглощенной дозы варьировалась от 0,45 до 4,5 МРад. После облучения осуществлялся контроль результатов, для чего стерильным шприцом производился забор микробной суспензии из кюветы и посев на плотную питательную среду. Параллельно проводился контрольный посев микробной культуры, необлученной пробы и контроль стерильности питательной среды. Материалы помещались в термостат при 37°C на 48 часов.

Результаты. Анализ результатов (Табл. 1) показал, что при поглощенной дозе 4,5 МРад проходит полное обезвреживание обеих культур. Рост не проявляется в течение двух суток, в то время как рост на контроле культуры проявляется уже через 24 часа.

Обезвреживание культуры *E. coli* проходит при дозе 1,75 МРад. Более высокой радиационной устойчивостью обладает *B. subtilis*. Разница в величине эффективной стерилизующей дозы обусловлена, по-видимому, совокупностью свойств бациллы. *B. subtilis* относится к спорообразующим бактериям, соответственно существует вероятность образования спор, чем, возможно, и объясняется более высокая устойчивость к облучению. Кроме того, *B. subtilis* относится к грамположительным микроорганизмам. Грамположительные бактерии отличаются меньшей радиационной чувствительностью [10].

Таблица 1

Результаты воздействия СЭП на культуры микроорганизмов

Микро- организм	Поглощенные дозы, МРад						Контр. культуры
	0,45	0,9	1,35	1,75	2	4,5	
<i>E. coli</i> (КОЕ/мл)	$>138 \times 10^2$	$(60 - 83) \times 10^2$	$(5 - 8) \times 10^2$	0	0	0	Сплошной рост
<i>B. subtilis</i> (КОЕ/мл)	Сплошной рост	Сплошной рост	$\geq 22 \times 10^2$	$\geq 15 \times 10^2$	$(0 - 8) \times 10^2$	0	Сплошной рост

При проведении количественной оценки была обнаружена устойчивая зависимость между величиной поглощенной дозы и бактерицидным эффектом излучения: с увеличением поглощенной дозы

концентрация выживших микроорганизмов снижалась. Данный факт говорит о наличии универсального поражающего действия импульсного электронного пучка на исследуемые микроорганизмы и перспективности его использования в качестве дезинфицирующего агента.

Закключение. Таким образом, на примере культур *E. coli* и *B. subtilis* доказано, что импульсный электронный пучок обладает бактерицидными и бактериостатическими свойствами. На основании проведенного исследования, можно утверждать, что СЭП эффективен для обезвреживания различных видов микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соковнин С. Ю. Наносекундные ускорители электронов и радиационные технологии на их основе: Автореф. дис. докт. техн. наук. – Екатеринбург, 2005 – 247 с.
2. WHO Wholesomeness of Irradiated Food. Report of a Joint FAO/IAEA WHO Expert Committee, Technical Report Series No. 659, (World Health Organization, Geneva, 1981).
3. M. Abboudi, M. AL-Bachir, Y. Kouddi, H. Jouhara. Combined Effects of Gamma Irradiation and Blanching Process on Acrylamide Content in Fried Potato Strips // International Journal of Food Properties, 19, 1447 (2016).
4. C.K. Waje, S.Y. Jun, Y.K. Lee, B.N. Kim, D.H. Han, C. Jo, J.H. Kwon. Microbial quality assessment and pathogen inactivation by electron beam and gamma irradiation of commercial seed sprouts // Food Control, 20, 200 (2009).
5. R. Bhat, K.R. Sridhar, A. A. Karim. Microbial quality evaluation and effective decontamination of nutraceutically valued lotus seeds by electron beams and gamma irradiation // Radiation Physics and Chemistry, 79, 976 (2010).
6. M. Al-Bachir. Some microbial, chemical and sensorial properties of gamma irradiated sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds // Food Chemistry, 197, 191 (2016).
7. A. T. Fintzoua, M. G. Kontominasa, A. V. Badekaa, M. R. Stahlb, K. A. Riganakos, Radiat. Phys. Chem. 76, 1147 (2007).
8. Ростов В.В., Алексеенко П.И., Выходцев П.В., Штейнле А.В. и др. Сильноточный импульсно-периодический ускоритель электронов прямого действия как средство стерилизации медицинских изделий однократного применения // Известия Томского политехнического университета. – 2012. – Т. 321. – №2. – С. 48-54.
9. Определитель бактерий Берджи в 2 т: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 800 с.
10. Туманян М.А., Каушанский Д.А. Радиационная стерилизация. – М.: Медицина, 1974. – 304 с.

**АКТИВНОСТЬ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗ СУПЕРСЕМЕЙСТВА FPG/NEI В ИНТЕРМЕДИАТАХ
ТРАНСКРИПЦИИ**

К.А. Макашева

Научный руководитель: профессор РАН, д.б.н. Д.О. Жарков

Новосибирский государственный университет,

Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 633090

E-mail: kristmak6@gmail.com

**EXCISION OF DAMAGED BASES FROM TRANSCRIPTION INTERMEDIATES BY FPG/NEI
SUPERFAMILY DNA GLYCOSYLASES**

К.А. Makasheva

Scientific Supervisor: Prof. RAS, Dr. D.O. Zharkov

Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogov str., 2, 633090

E-mail: kristmak6@gmail.com

Abstract. *Oxidative lesions are abundant due to constant presence of reactive oxygen species in living cells. Repair of oxidative base lesions is initiated by DNA glycosylases. For example, bacterial Fpg and Nei DNA glycosylases excise oxidized purines and pyrimidines, respectively, from DNA. Their human homologs, NEIL1 and NEIL2, have been reported to show preference towards oxidized lesions in DNA bubbles. From these observations, it had been hypothesized that NEIL proteins may be involved in the repair of lesions in DNA bubbles generated during transcription. However, it is not presently clear how NEILs would behave on bubbles more closely resembling transcription intermediates (e. g., containing the RNA strand), and bacterial homologs Fpg and Nei had never been investigated with bubble substrates. We have studied excision of either 8-oxoguanine (8-oxoG) or 5,6-dihydrouracil (DHU) by E. coli Fpg and Nei and human NEIL1 and NEIL2 from single-strand oligonucleotides, perfect duplexes, bubbles with different number of unpaired bases (6 to 30), D-loops with DNA or RNA and from complexes with RNA polymerase. Fpg, NEIL1 and NEIL2 efficiently excised DHU located inside a bubble. Fpg and NEIL1 was generally more active than NEIL2 in excision of 8-oxoG from ssDNA and bubbles. Nei, on the other hand, was active only on DHU located in dsDNA (either perfect duplex or DNA/DNA D-loop). Fpg and NEIL1 also have shown activity in D-loops with RNA. The activity of Fpg was observed in pre-assembled transcriptional complexes with E. coli RNA polymerase and depended on the position of the lesion in the transcription bubble, possibly reflecting local accessibility of the lesion within the elongation complex.*

Введение. Окислительные повреждения широко распространены в клетках эукариот, что обусловлено постоянным присутствием в них активных форм кислорода. Эксцизионная репарация оснований — система репарации, исправляющая большинство повреждений в ДНК и восстанавливающая исходную последовательность нуклеотидной цепи. (Рис. 1). ДНК-гликозилазы человека NEIL1 и NEIL2 (эукариотические гомологи белков Fpg и Nei Escherichia coli) проявляют повышенную активность в удалении окислительных повреждений из «глазков» — двуцепочечных участков, не стабилизированных комплементарными связями [1]. Предполагается, что это может

Результаты. Как NEIL1, так и NEIL2 активно удаляли повреждения из одноцепочечного участка D-петли с РНК или ДНК, причем активность NEIL1 была заметно выше активности NEIL2. Для обоих ферментов 5,6-дигидроурацил был лучшим субстратом, чем 8-оксогуанин. Было показано также влияние размера «глазка» и положения повреждения в нем на активность ферментов.

Кинетические параметры реакции, катализируемой ДНК-гликозилазой Fpg, свидетельствуют о том, что образование фермент-субстратного комплекса с двуцепочечными областями ДНК происходит более эффективно, чем с одноцепочечными, в то время как каталитическая стадия реакции для всех типов субстратов протекает с примерно одинаковой скоростью (Табл. 1).

Таблица 1

Кинетические параметры реакции расщепления различных субстратов с ohoG ферментом Fpg

S	оцДНК- охоG	дцДНК- охоG	«глазок»18- охоG	дц-Дпетля- охоG	оц-Дпетля- охоG	дцДНК- охоG*
k_{cat} , мин ⁻¹	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,12 ± 0,01	–	0,13 ± 0,01
K_M , нМ	300 ± 150	3,3 ± 0,9	170 ± 50	83 ± 17	–	8,1 ± 2,3
$k_{cat}/K_M \times 10^3$, 1/(мин×нМ)	0,37 ± 0,15	31 ± 9	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,1	9,3 ± 3,9

*дц-субстраты длиной 23 п.н., значения взяты из [4].

В присутствии РНК-полимеразы II активность ДНК-гликозилазы Fpg *E. coli* снижалась вследствие стерических затруднений, вызванных экранированием субстрата РНК-полимеразами. Показано, что эксцизионная репарация ohoG в составе кодирующей цепи ферментом Fpg не подавляет процесс транскрипции.

Выводы. Полученные результаты показывают, что белки NEIL действительно могут быть задействованы в репарации повреждений в ходе транскрипции, однако для прямого определения возможности этого необходимо исследование активности этих ферментов на интермедиатах транскрипции в комплексе с РНК-полимеразой человека и получение изоформы 2с фермента NEIL2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dou H., Mitra S., Hazra T. K. (2003). Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *Journal of Biological Chemistry*, no. 50, pp. 49679–49684.
2. Грин И. Р., Жарков Д. О. Эукариотические гомологи эндонуклеазы VIII: новые элементы системы эксцизионной репарации оснований ДНК // *Биохимия*. – 2011. – Т. 76. – No. 1. – С. 99–114.
3. Zharkov D. O. (2008). Base excision DNA repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, no. 10, pp. 1544–1565.
4. Tchou J., Bodepudi V., Shibutani S., Antoshechkin I., Miller J., Grollman A. P., Johnson F. (1994). Substrate specificity of Fpg protein: Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *Journal of Biological Chemistry*, no. 21, pp. 15318–15324.

**РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА РЕПАРАЦИИ ДНК ТИРОЗИЛ-ДНК-
ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ И ЕГО ПРИРОДНОГО МУТАНТА SCAN1 В КАЧЕСТВЕ
ПРОТОТИПОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Е.М. Мамонтова^{1,2}

Научный руководитель: к.х.н. А.Л. Захаренко

¹Новосибирский государственный университет, Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8, 630090

E-mail: evgeniya.mm.94@gmail.com

**TYROSYL-DNA PHOSPHODIESTERASE 1 (TDP1) AND ITS NATURAL MUTANT SCAN1
INHIBITORS DEVELOPMENT AS PROTOTYPES OF DRUGS**

E.M. Mamontova^{1,2}

Scientific Supervisor: PhD A.L. Zakharenko

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

²Novosibirsk Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,

Russia, Novosibirsk, Akademika Lavrentieva Ave. 8, 630090

E-mail: evgeniya.mm.94@gmail.com

Abstract. *In the present study, we performed screening of 21 compounds – derivatives of coumarin as inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) and its mutant SCAN1. The ability of these compounds to inhibit Tdp1, important target for anti-cancer therapy, was studied. The most active derivatives have IC₅₀ value of 0,1-1 mkM. SCAN1 inhibitors were found first in the world. They can likely underlie the development of drugs preventing or slowing the progressive cerebellar atrophy to improve quality of life of SCAN patients.*

Введение. Цитотоксический эффект двух основных клинически одобренных методов лечения злокачественной опухоли (химиотерапия или радиация) напрямую связан с их способностью вызывать повреждения ДНК. В то же время способность раковых клеток распознавать повреждения ДНК и инициировать репарацию ДНК является ключевым механизмом терапевтической резистентности к химиотерапии. А потому поиск мишеней для ферментов репарации ДНК, используемый для противоракового терапевтического воздействия, может быть использован в качестве стратегии потенцирования цитотоксичности имеющихся ДНК-разрушающих агентов.

Одним из перспективных ферментов-мишеней для создания лекарственных препаратов является тирозил-ДНК-фосфодиэстераза [1].

Tdp1 относится к классу фосфодиэстераз – ферментов, расщепляющих фосфодиэфирные связи. Tdp1 играет важную роль в удалении повреждений ДНК, создаваемых топоизомеразой 1 (Top1), ее ингибитором камптотецином и антираковыми препаратами. Таким образом, Tdp1 противостоит ингибиторам Top1, которые являются достаточно эффективными антираковыми препаратами.

В активном центре Tdp1 находится два консервативных каталитических остатка гистидина: нуклеофильный гистидин, атакующий субстрат с формированием ковалентного 3'-фосфогистидинового интермедиата, и гистидин-общее основание/кислота, который разрывает связь Tdp1-ДНК [2].

Природный мутант Tdp1 с заменой His-493 на Arg-493 вызывает тяжелое нейродегенеративное заболевание – синдром спинocerebellарной атаксии с аксональной нейропатией (SCAN1). Точные молекулярные механизмы, приводящие к заболеванию SCAN1, до сих пор непонятны. У пациентов со SCAN1 этот фенотип не проявляется до второй декады жизни и не связан с повышенным риском онкологических заболеваний или иммунодефицитных состояний. Вероятно, патологию вызывает накопление образующихся в ходе реакции ковалентных интермедиатов SCAN1-ДНК [3]. Это позволяет предполагать, что подавление активности SCAN1 улучшит состояние этих пациентов и/или предотвратит прогрессирование болезни. В настоящее время данные об ингибиторах SCAN1 отсутствуют. Таким образом, целью работы является разработка ингибиторов ферментов Tdp1 и SCAN1 в качестве прототипов лекарственных препаратов.

Материалы и методы исследования. В ходе исследуемой реакции происходит отщепление тушителя флуоресценции, катализируемой ферментами Tdp1 и SCAN1 с использованием биосенсора олигонуклеотида New7FAM/BHQ (5'-FAM-ggaagaccctgacgt-BHQ1-3'). Данный биосенсор представляет собой 16-мерный одноцепочечный олигонуклеотид, несущий FAM – флуорофор на 5'-конце и тушитель флуоресценции Black Hole Quencher 1 (BHQ1) на 3'-конце. Интенсивность флуоресценции флуорофора возрастает при удалении тушителя. В качестве потенциальных ингибиторов ферментов Tdp1 и SCAN1 были использованы соединения, представляющие собой производные природного биологически активного вещества кумарина. Для измерения флуоресценции использовался флуориметр POLARstar OPTIMA производства BMG LABTECH.

Реакционные смеси объемом 200 мкл содержали буфер (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM NaCl; 7 mM меркаптоэтанол), 50 нМ олигонуклеотид и различные концентрации ингибиторов. Реакция запускалась добавлением одного из ферментов: Tdp1 до конечной концентрации 1,5 нМ или SCAN1 до конечной концентрации 150 нМ. Измерения проводились в линейном диапазоне зависимости скорости реакции от времени (до 8 минут) через каждые 55 секунд. Влияние предлагаемых соединений оценивали по величине IC_{50} (концентрация ингибитора, при которой активность фермента снижена наполовину). Обсчет значений IC_{50} проводился с помощью программы MARS Data Analysis 2.0 (BMG LABTECH).

Определение цитотоксичности производных кумарина проводили с помощью стандартного МТТ-теста на клеточных линиях HeLa (клетки рака шейки матки человека) и HEK 293 (клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека) [4].

Результаты. В ходе работы было проверено действие 21 вещества на скорость реакции отщепления тушителя флуоресценции. Обнаружено 6 соединений, обладающих ингибирующей активностью по отношению к SCAN1, 14 – по отношению к Tdp1. Для данных ингибиторов были определены значения IC_{50} (Табл. 1). Ингибирующая способность некоторых веществ как по отношению к Tdp1, так и по отношению к SCAN1 говорит о действии данных ингибиторов на стадию связывания фермента с субстратом, либо на первую стадию ферментативной реакции (образование ковалентного комплекса с ДНК). Тогда как вещества, ингибирующие только Tdp1, влияют на вторую стадию ферментативного катализа, которая отсутствует в случае SCAN1.

Цитотоксичность соединений определить не удалось, т.к. значения CC_{50} оказались выше 100 мкМ и не могут быть определены в связи с ограниченной растворимостью веществ. Единственным исключением оказалось соединение 52984 при воздействии на клетки HeLa, величина CC_{50} 11 мкМ.

Таблица 1

Значения IC_{50} для исследуемых ингибиторов

Ингибитор	IC_{50} (SCAN1)	IC_{50} (Tdp1)	Ингибитор	IC_{50} (SCAN1)	IC_{50} (Tdp1)
45744	-	15,4±4,5 мкМ	52646	-	7,6±1,3 мкМ
49689	3,5±2,3 мкМ	(9,9±4,4)*10 ⁻⁸ М	52984	6,0±1,5 мкМ	(3,6±1,9)*10 ⁻⁷ М
50227	-	12,9±3,0 мкМ	54924	-	3,1±0,8 мкМ
51792	13,9±5,6 мкМ	0,25 мкМ	55562	-	(2,7±1,9)*10 ⁻⁷ М
51918	25,1±13,7 мкМ	0,5 мкМ	56104	-	5,6±1,9 мкМ
52144	-	3,5±0,3 мкМ	56301	17,6±6,1 мкМ	(9,8±6,0)*10 ⁻⁷ М
52466	-	0,85±0,5 мкМ	56709	14,1±1,9 мкМ	1,3±0,1 мкМ

Вывод. Проведен скрининг 21 соединения – производных камптотецина как ингибиторов Tdp1 и SCAN1. Для данных ингибиторов были определены ингибиторные характеристики в отношении Tdp1 и SCAN1, цитотоксичность для перевиваемых опухолевых клеток, а также предположительный механизм ингибирования реакции.

Обнаружены ингибиторы Tdp1 со значением $IC_{50} \sim 10^{-7}$ М, что на сегодняшний день является результатом мирового уровня. Данные соединения показали низкую цитотоксичность по отношению к клеткам НЕК 293 и HeLa. Низкая цитотоксичность ингибиторов ($CC_{50} > 100$ мкМ) имеет большое значение для дальнейшего применения данных веществ в комбинации с противораковыми препаратами, используемыми в настоящее время. Ожидается, что ингибиторы Tdp1 усилят чувствительность раковых клеток к ингибиторам Top1, применяемым в клинической практике. Таким образом, производные кумарина являются ингибиторами Tdp1, перспективными для дальнейшей разработки сенситизаторов опухолевых клеток к действию традиционных химиопрепаратов.

Ингибиторы мутантной формы SCAN1 обнаружены впервые в мире. Полученные результаты могут быть применены для дальнейшей разработки препаратов на основе изученных ингибиторов для подавления активности фермента у пациентов, страдающих от заболевания SCAN, и как следствие улучшения их состояния и предотвращения прогрессирования болезни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dexheimer TS., Antony S., Marchand C., Pommier Y. (2008) Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase as a Target for Anticancer Therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, V. 8, no 4, pp. 381–389.
2. Kuznetsov N.A., Lebedeva N.A., Kuznetsova A.A., Rechkunova N.I., Dyrkheeva N.S., Kupryushkin MS¹, Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V., Fedorova O.S., Lavrik O.I. (2016) Pre-steady state kinetics of DNA binding and abasic site hydrolysis tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *J Biomol Struct Dyn*, V. 16, pp. 1-14.
3. Interthal H., Chen H.J., Kehl-Fie T.E., Zotzmann J., Leppard J.B., Champoux J.J. (2005) SCAN1 mutant Tdp1 accumulates the enzyme-DNA intermediate and causes camptothecin hypersensitivity. *EMBO J*, V. 24, no 12, pp. 2224–2233.
4. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth*, V. 65, pp. 55–63.

ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ В КОЖЕ.

Г. А. Мартынов

Научный руководитель: к. м. н. И. Г. Белялова
Сибирский государственный медицинский университет
Россия, Томск, Московский тракт, 2, 634050

DISINTEGRATION OF MATERIALS IN THE SKIN.

G. A. Martynov

Scientific Supervisor: Ph.D. I. G. Belyalova
Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt 2, 634055

Abstract. *Due to a widespread use of filament techniques in cosmetology (thread-lifting by 3D meso threads), there is a need to investigate the effect of threading on cellular reactions. In this paper, we study synthetic polydioxanone threads of size 30G. Fibrosis was shown [1] to be formed after the introduction (insertion) of these threads in a procedure zone. Thus, this study aims to investigate the cellular response to the thread introduction (insertion).*

Тредлифтинг – это инъекционный метод коррекции контуров лица, предусматривающий внутрикожное введение саморассасывающихся нитей из полидиоксанона, активизирующих процесс образования нового коллагена и создающих своеобразный механический каркас, ликвидирующий провисание кожи.

Существует различные виды лифтинга: эндоскопический лифтинг, круговая подтяжка, аппаратный лифтинг, лазерный лифтинг, микротоковый лифтинг, ультразвуковой лифтинг, радиоволновой лифтинг (RF-лифтинг), фотолифтинг, плазмолифтинг, лифтинг с использованием инъекций гиалуроновой кислоты.

Тредлифтинг совмещает в себе преимущества двух методик, от которых, собственно, он и получил такое необычное название. Во-первых, он оказывает ярко выраженное подтягивающее действие. Во-вторых, он сродни мезотерапии, что также дает омолаживающий эффект. Механизм действия мезонитей: непосредственный эффект лифтинга за счет армирующего действия нитей. Во время введения врач может проводить нить на разной глубине и в разных направлениях, что позволяет получать 3D-эффект: выравнивать рельеф кожи, подтягивать обвисшие её участки. Длительное сохранение эстетического эффекта за счет неоколлагеногенеза. Можно применять и для формирования контуров тела. Если ранее использование платиновых или золотых нитей имело риск проявления материала при резком похудении и при очень тонкой коже, теперь эта проблема решена. Дополнительно 3d омоложение мезонитями запускает неоколлагеноз. Это значит, что новый активный коллаген формируется уже вокруг полидиаксанона. Однако, эффект после данных процедур временный, в среднем достигает 6-12 месяцев, максимально может сохраняться 24 месяца, и находится в прямой зависимости от типа кожи, типа старения, возраста, выбранной методики, выбранных материалов.

Тредлифтинг 3D-мезонитями – методика безоперационной подтяжки, позволяющая моделировать ткани в любых направлениях. По сути это техника установки нитей из абсолютно безопасного

саморассасывающегося материала, возвращающая правильные черты молодого лица, четкие контуры фигуры, великолепное качество кожи.

3D-мезонити – нити, созданные из современного материала, для безоперационного лифтинга кожи лица и тела. Результат от их применения основан на сочетании двух методик: мезотерапии и нитевой подтяжки кожи. Мезонити созданы из различного интактного материала, как натурального, так и синтетического происхождения.

Мезонити состоят из двух частей: Первая часть – гибкая игла, или так называемый коннектор. За счет своей гибкости она дает разнонаправленное моделирование тканей на разных глубинах. Вторая часть – сама мезонить, которая протянута внутри иглы (коннектора).

Отдаленный эффект основан на «мезотерапевтическом» действии 3D-мезонитей. Через несколько месяцев они рассасываются. Когда нити начинают рассасываться, они одновременно замещаются собственным коллагеном кожи – на их месте формируется собственный, усиленный каркас кожи, делающий её более упругой [1].

Биодеградация мезонитей состоит из 2 этапов. В первый этап (от 3 до 6 нед) происходит гидролиз внешней оболочки нити. Во втором этапе происходит ее дробление, вследствие продолжающегося гидролиза, что приводит к увеличению количества мелких фрагментов и полной деградации нити.

Классификация мезонитей по составу: 1. Нити Monofilament (Polypropylene, Polydioxanone, Nylon, Catgut, Steel); 2. Multifilament (Polyester, Silk, Cotton, Polyamide, Vicryl, dextron).

Классификация мезонитей по форме и виду: 1. Линейные мезонити. Используются при коррекции периоральной зоны, шеи, подбородка, области лба, верхнего века и висков. 2. Игольчатые нити. Это структуры, оснащенные специальными насечками. Они обеспечивают стойко выраженную фиксацию тканей средней трети лица. 3. Спиральные 3D-мезонити. Применяются для коррекции губоподбородочных и носогубных складок, области декольте и бровей.

Таблица 1.

Классификация мезонитей

	Родовое название		Сырье	Сохранение прочности (дни)
Натуральные	Простой кетгут		Подслизистая обол. Т. К. овец	5-7
Натуральные	Хромированный кетгут		Кетгут импрегнированный солями хрома	10-21
Синтетические	Помиглицопиеновая кислота (40-60 дней)	Dexon	Гомополимер гликопида	24-30
Синтетические	Полиглактин	Vicryl	Сополимер молочной и гликолевой кислот	24-30
Синтетические	Полидиоксозон(180-240)	PDS	Полиэстер-полимер	67-70
Синтетические	Полигликонат	Maxon		40-50
Синтетические	Полиглекапрон 25	Monocryl	Кликопид	21-28

По данным исследований производителей мезонитей, после внедрения нитей не отмечается никаких морфологических изменений кожи. Однако с практической точки зрения, многие хирурги отмечают, что после произведённой лифтинговой коррекции отмечается увеличение плотности кожных покровов. Это связывают с образованием фиброза, после данной процедуры. Так же имеется точка зрения о возможности развития синдрома отторжения, онкологических заболеваний.

В связи с этим целью данной работы является выявление морфологических изменений кожи, вызванных внедрением полидеаксоновых мезонитей.

Для исследования были взяты: 20 белых мышей, различной возрастной группы (1 мес., 2 мес. и 3 мес.), разделенные на 2 временные группы: 1 группа - 14 дней, 2 группа - 28 дней.

Мыши были взяты в связи сходности гистологической картины с кожей человека.

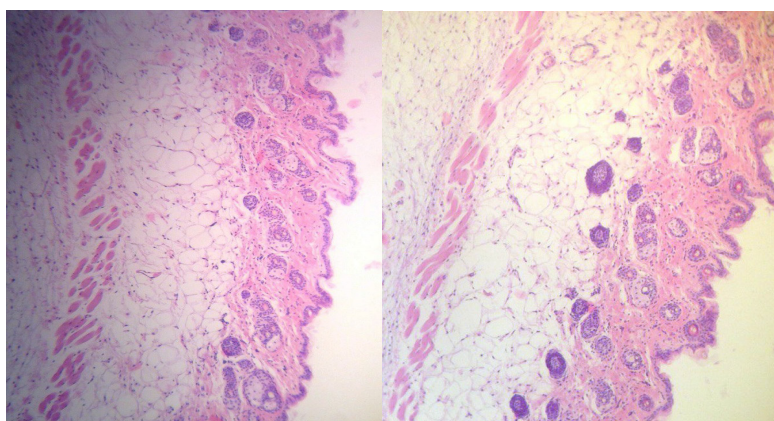


Рис. 1 Гистологическая картина кожи: слева- кожа мыши, справа- кожа человека

Мыши были введены в состояние наркоза с помощью эфира, после чего на дорсальной поверхности (на спине) на расстоянии 1,5 см от хвоста, были введены нити (6 штук: 3 продольно, 3 перпендикулярно), на расстоянии около 3 мм друг от друга. После проведения процедуры выведены из состояния наркоза. Спустя 14 дней 1 временная группа мышей были забиты и взяты лоскуты кожи, размером превышающим поле введения нитей приблизительно 1 см, для более точного гистологического исследования. Данные лоскуты были помещены в 6% формалин и отданы в НИИ онкологии для проведения гистологического исследования. Было получено 11 предметных стекол и описание гистологического исследования. В препаратах отсутствует воспалительный инфильтрат, морфологических изменений не обнаружено, отсутствуют участки фиброза. Отмечаются полнокровные сосуды. Инородных образований в пределах исследованного материала не обнаружено. Спустя 14 дней была забита и 2 временная группа, дальнейшая процедура описана выше.

По результатам проведенного исследования, было установлено, что данные нити полностью рассасываются после их внедрения в коже и не вызывают морфологических изменений кожи. Из результатов данного исследования можно сделать вывод, что данные нити не вызывают фиброза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Braff MH. Dj Nardo A, Gallo RL. Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies // O Invest Dermatol. – 2005. –V.124. – P. 39.

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕГИЛИРОВАННОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО
КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ПРИ НАРУШЕНИЯХ СПЕРМАТОГЕНЕЗА,
ВЫЗВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЕМ ИСТОЧНИКОВ ЕГО ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПУЛА**

В.А. Машанова, С.И. Камалова

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Т.Г. Боровская

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634034

E-mail: lgrig2@mail.ru

**EFFICIENCY PEG – GRANULOCYTE COLONY – STIMULATING FACTOR IN
SPERMATOGENESIS FAILURE, CAUSE DAMAGE TO THE SOURCE OF ITS PROLIFERATIVE
POOL**

V.A. Maschanova, S.I. Kamalova

Scientific Supervisor: Prof., Dr. T.G. Borovskaya

Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named E.D. Goldberg

Russia, Tomsk, Lenin str., 3, 634034

E-mail: lgrig2@mail.ru

***Abstract.** In experimental studies carried out on rats of Wistar population, comparative evaluation of pharmacological efficacy of PEG - granulocyte stimulating factor and granulocyte stimulating factor with testicular failure due to damage to the spermatogonial stem cells. It was found that PEG-CSF is more effective stimulant of reparative regeneration processes of testicular tissue.*

Актуальность. Последние десятилетия характеризуются беспрецедентным возрастанием мужской infertility [1]. Это связывают с существенным повышением уровня токсических эндогенных воздействий. В настоящее время существует обоснование повышенной потребности средств фармакотерапии, стимулирующих процессы репаративной регенерации мужских половых желез в условиях дефицита стволовых сперматогонияльных клеток (ССК) [2,3]. Повреждение ССК происходит при действии радиации и у пациентов, получающих цитостатическое лечение по поводу ревматоидных и онкологических заболеваний. Данные литературы свидетельствуют о том, что в последние годы отмечается существенное возрастание (в 2 раза) частоты заболеваемости ревматоидным артритом. Благодаря успехам лечения злокачественных новообразований, в настоящее время возросло число пациентов, излеченных от онкологической патологии, и желающих реализовать свою способность к деторождению [1].

Известно, что пролиферации ССК ограничена количеством клеток микроокружения (клетки Сертоли – КС), которые в зрелой сперматогенной ткани митотически инертны. Репаративная регенерация структурных компонентов семенника идет путем формирования новых канальцев незрелого типа из регенераторной зоны, в которой КС обладают способностью к делению, что не ограничивает размножение ССК [4]. Однако возможности собственной системы репаративной регенерации семенников при существенном повреждении ССК оказываются не состоятельными. Этот процесс можно

фармакологически стимулировать с помощью средств, обладающих способностью мобилизовать стволовые клетки костного мозга в периферическую кровь с их последующим хомингом в поврежденные ткани и активацией региональных стволовых клеток. К числу таких средств относится гранулоцитарный колониестимулирующий фактор Г–КСФ [2, 3]. Однако использование Г–КСФ ограничено из-за серьезных побочных эффектов. В НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга совместно с компанией «Саентифик Фьючер Менеджмент», для снижения токсичности Г–КСФ был иммобилизован на полиэтиленгликоль с помощью метода электронно-лучевого синтеза. В результате был получен новый препарат – пегилированный ГКСФ (ПЭГ–ГКСФ).

Цель. Целью настоящего исследования явилось проведение экспериментальной сравнительной оценки эффективности Г–КСФ и ПЭГ–ГКСФ на модели тестикулярной недостаточности, обусловленной истощением пролиферативного пула сперматогенеза.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проведен на 60 аутбредных крысах-самцах (сток CD), массой 250-300 г. Недостаточность сперматогенеза, обусловленную повреждением стволовых сперматогонимальных клеток, моделировали однократным внутривенным введением в максимально переносимой дозе цитостатического препарата паклитаксел. Животным экспериментальных групп вводили Г–КСФ и ПЭГ–ГКСФ 1 раз в день в течение 5 дней в дозе 100 мкг/кг. В эксперименте также были использованы интактные животные (фон). Через 1,5, 2 и 3 месяца (сроки проявления токсического действия на сперматогонию) проводили эвтаназию животных (в CO₂ камере), извлекали эпидидимис и семенник. Определяли общее количество половых клеток, приходящихся на придаток семенника (ОКС). На парафиновых срезах семенников, толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилин эозином, подсчитывали количество сперматогоний, КС; вычисляли степень зрелости сперматогенного пласта [4]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием непараметрического U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты. Установлено, что через 1,5 месяца после введения паклитаксела в семенниках крыс контрольной группы выявлялись отдельные признаки обновления тестикулярной ткани, судя по достоверному снижению степени зрелости сперматогенного пласта (Рис.1,в). Однако степень выраженности этих признаков оказалась незначительной. В связи с этим, процесс репаративной регенерации ткани оказался несостоятельным: общее количество сперматогоний и половых клеток во все сроки наблюдения не возрастали по сравнению с значениями фона. Через 1,5 месяца в семенниках крыс, получавших на фоне введения паклитаксела Г–КСФ, также выявлялось снижение степени зрелости сперматогенного пласта. Однако при этом отмечалось достоверное возрастание количества КС (Рис.1,б). Стимуляция репаративных процессов в этой группе животных привела к возрастанию продуктивности сперматогенеза. В последующие сроки наблюдения отмеченные признаки репаративной регенерации были выражены в большей степени. Через 2 месяца после начала опыта продуктивность сперматогенеза достигала фоновых значений. Количество сперматогоний к концу эксперимента (3 мес) достоверно превышало контрольные значения, но не достигало фона (Рис.1,а). Через 1,5 месяца после начала опыта, в семенниках крыс, получавших на фоне введения паклитаксела ПЭГ–ГКСФ, признаки репаративной регенерации сперматогенной ткани оказались выражены в большей степени, чем после использования непегилированной молекулы. В результате этого уже в первый период наблюдения отмечалось увеличение количества сперматогоний и ОКС. Через 2 месяца после начала опыта, количество

сперматогоний у крыс этой группы животных достигало фоновых показателей, а продуктивность сперматогенеза достоверно возросла в 2 раза по сравнению с фоном (Рис. 1, г).

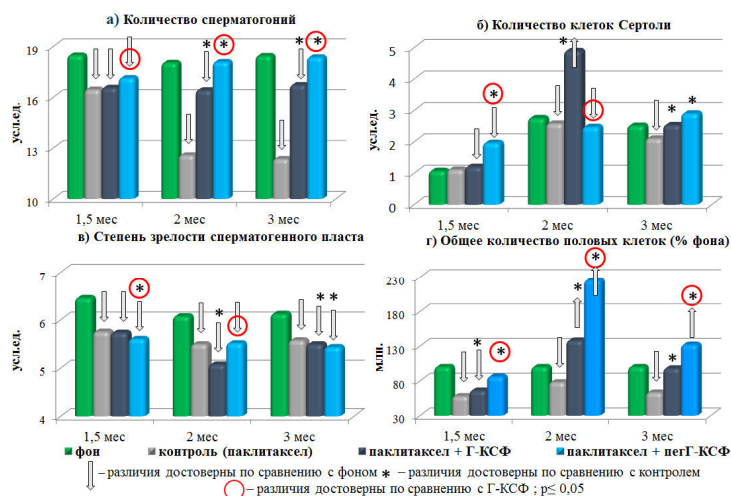


Рис.1. Состояние сперматогенеза крыс в отдаленные сроки после сочетанного введения паклитаксела и Г-КСФ или ПЕГ-Г-КСФ

Через 3 месяца после введения паклитаксела в семенниках крыс, получавших паклитаксел и ПЕГ-ГКСФ, признаков тестикулярной недостаточности не выявлялось. В тоже время, судя по степени зрелости сперматогенного пласта и количеству КС, репаративная регенерация ткани продолжалась.

Выводы. Восстановление численности клеточной популяции сперматогоний после введения паклитаксела и Г-КСФ не завершилось через 3 месяца после начала опыта, когда на фоне использования ПЕГ-ГКСФ – завершилось уже через 2 месяца. У крыс, получавших ПЕГ-ГКСФ, продуктивность сперматогенеза возрастала в большей степени, чем после введения его непегилированной формы. Таким образом, ПЕГ-ГКСФ является высокоэффективным средством стимулирующим процессы репаративной регенерации сперматогенной ткани, при повреждении источников пролиферативного пула сперматогенеза. Эффективность непегилированной формы препарата оказалась менее выраженной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Punab M., Poolamets O., Paju P., Vihlajev V., Pomm K., Ladva R., Korrovits P., Laan M. (2017). Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. Human Reproduction, no. 1, pp. 18-31.
2. Рак и репродукция / Под ред. А.А. Параконной. – М.: Галеон, 2012. – 208 с.
3. Kotzur T., Benavides-Garcia R., Mecklenburg J., Sanchez J. R., Reilly M., Hermann B.P. (2017). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) promotes spermatogenic regeneration from surviving spermatogonia after high-dose alkylating chemotherapy. Reprod Biol Endocrinol., no.15, pp. 7.
4. Сухоруков В.С., Шамшад Д.Е. Определение степени зрелости сперматогенного пласта крысы при его регенерации и в процессе созревания интактного семенника // Арх. анат., гист. и эмбриологии. – 1989. – № 9. – С. 89 – 91.

**СВЯЗЬ ХИТИНАЗО-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ
У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

И.В. Митрофанова^{1,2}, М.М. Цыганов^{1,2}, Н.С. Телегина³

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

³Сибирский государственный медицинский университет, г.Томск, Московский тракт, 2, 634050

E-mail: mitrof@mail.ru

**ASSOCIATION OF CHITINASE-LIKE PROTEINS WITH METASTASIS
IN PATIENTS WITH BREAST CANCER**

I. V. Mitrofanova^{1,2}, M. M. Tsyganov^{1,2}, N. S. Telegina³

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

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

² Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
Russian Federation, Tomsk, Cooperative str., 5, 634009

³Siberian State Medical University, 2 Moskovsky trakt, Tomsk, 634050

E-mail: mitrof@mail.ru

Abstract. *In the present study, we performed the analysis of chitinase-like protein expression in specimens from patients with breast cancer. It was found that a higher risk of lymphogenous and hematogenous metastasis in patients with breast cancer was associated with a low level of YKL39 gene expression. We supposed that different variants of parenchymal-stromal-inflammatory relationship in tissue can determine the nature of lymphogenous and hematogenous metastasis, as well as the tumor response to chemotherapy. These processes are realized through the functional interrelation of cells of the inflammatory infiltrate and other components of tumor microenvironment with cells of the tumor itself.*

Введение. В последние годы получены данные о вовлечении хитиназо-подобных белков в функционирование опухолеассоциированных макрофагов, которые регулируют взаимоотношения инфильтрирующих опухоль иммунокомпетентных клеток с опухолевыми клетками и с другими компонентами микроокружения, а также пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез, процессы диссеминации [1]. Хитиназо-подобные белки (ХПБ, Chitinase-like proteins, CLP) – новый класс белков, относящихся к семейству Glyco_18 домен-содержащих белков [2]. У человека идентифицировано три хитиназо-подобных белка: YKL-40 (CHI3L1), YKL-39 (CHI3L2) и стабиллин-1-взаимодействующий хитиназо-подобный белок (SI-CLP). Хитиназо-подобные белки продуцируются несколькими типами клеток и сочетают в себе свойства цитокинов и факторов роста [3]. На сегодняшний день роль ХПБ в опухолевой прогрессии рака молочной железы не изучена, и сведения относительно молекулярных механизмов их действия фрагментарны.

Материал и методы исследования. В исследование включены 36 больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа $T_{1-3}N_{0-3}M_0$ без предоперационного лечения. Определялось наличие цитоплазматической экспрессии маркеров иммуногистохимическим методом в клетках воспалительного инфильтрата в разных сегментах опухоли: 1) в участках с нежнотовлокнистой стромой; 2) в участках с грубоволокнистой стромой; 3) в областях с так называемым «максимальным стромально-паренхиматозным взаимоотношением»; 4) среди паренхиматозных элементов; 5) в просветах протоковых опухолевых структур.

Уровень экспрессии гена YKL-39 оценивали в биопсийных образцах опухолевой ткани от 112 больных раком молочной железы при помощи количественной полимеразной цепной реакции (qPCR) по технологии TaqMan (методика описана в [4]).

Результаты. С помощью иммуногистохимического анализа была обнаружена прямая корреляционную зависимость между выраженностью экспрессии YKL-40 в клетках воспалительного инфильтрата в участках с нежнотовлокнистой стромой и экспрессией LYVE1 в участках с нежнотовлокнистой стромой ($r=0,72$; $p=0,04$) и в участках с грубоволокнистой стромой ($r=0,94$; $p=0,001$) у больных раком молочной железы. Эти данные не противоречат данным, которые были обнаружены при исследовании уровня сывороточного YKL-40 при раке молочной железы [5].

При исследовании ассоциации маркеров макрофагов в опухоли с маркером эндотелиальных клеток лимфатических сосудов была показана важность учета паренхиматозно-стромально-воспалительного компартмента, в котором выявлены те или иные маркеры. В зависимости от локализации в том или ином участке опухоли, выявляются особенности функционирования макрофагов.

Кроме того, при помощи qPCR нами было обнаружено, что более высокий риск лимфогенного метастазирования у пациенток с раком молочной железы был ассоциирован с низким уровнем генной экспрессии YKL-39. Уровень экспрессии гена YKL-39 в биопсийных образцах ткани опухоли молочной железы нормализовали на уровень экспрессии в нормальной (неизменной ткани молочной железы), поэтому уровень более 1 YE ($YKL-39>1$) рассматривался как гиперэкспрессия, наоборот, уровень экспрессии гена белка YKL-39 ниже 1 YE ($YKL-39<1$) рассматривался как гипоекспрессия (ниже, чем в нормальной ткани). При гипоекспрессии частота лимфогенных метастазов составила 62,5% (50/80) при гиперэкспрессии YKL-39 частота лимфогенных составила 37,5% (12/32) (OR (95% C.I.)=2.78 (1.19-6.47), $p=0,028$ по критерию Фишера). Таким образом, гиперэкспрессию гена YKL-39 в опухоли можно рассматривать как благоприятный критерий, указывающий на низкий риск развития лимфогенных метастазов, а гипоекспрессию как неблагоприятный показатель, указывающий на высокий риск развития лимфогенного метастазирования.

Также, более высокий риск возникновения гематогенных метастазов у больных раком молочной железы был ассоциирован с низким уровнем генной экспрессии YKL-39 $0,704\pm0,355$ у больных с метастазами против $2,561\pm0,722$ у больных без гематогенных метастазов ($p=0,0026$). При гиперэкспрессии (более 1) гена YKL-39 в опухоли частота гематогенных метастазов составила 6,3% (2/32), в то время как в группе больных с гипоекспрессией (менее 1) YKL-39 частота гематогенных метастазов составила 34,4% (22/64). (OR (95% C.I.)=7.86 (1.71-35.97), $p=0,005$, по критерию Фишера). На рисунке 1 представлена безметастатическая выживаемость по методу Каплана-Майера больных РМЖ в зависимости от гипо- или гиперэкспрессии гена YKL-39 в опухоли до лечения.

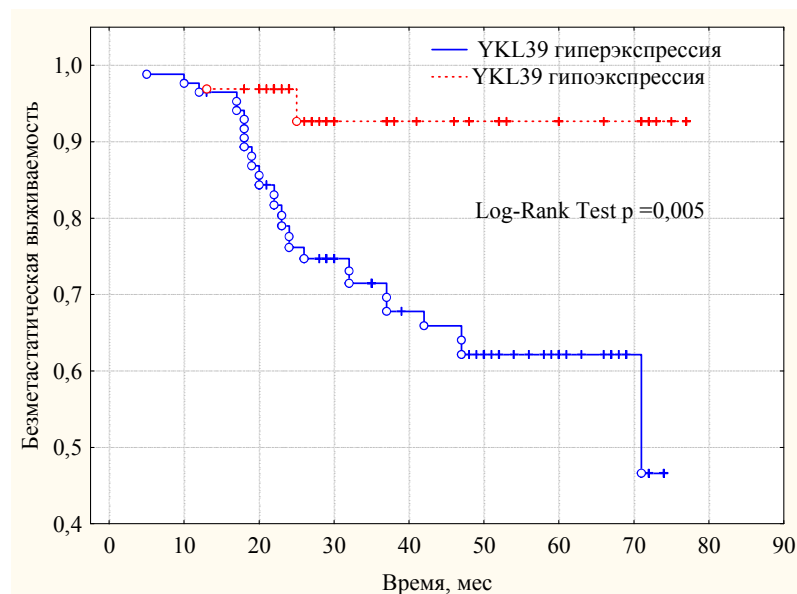


Рис. 1. Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от уровня экспрессии гена YKL-39 в опухоли до лечения.

Выводы. Гиперэкспрессия гена YKL-39 в опухоли молочной железы до лечения может рассматриваться как благоприятный прогностический фактор лимфогенного и гематогенного метастазирования, а гипоэкспрессия – как неблагоприятный фактор прогноза, ассоциированный с высоким риском лимфогенного и гематогенного метастазирования (поданы заявки на патент).

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-54-76015 ЭРА_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Noy, R., Pollard J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*, no.41, pp. 49–61.
2. Meng, G., Zhao, Y., Bai, X., Liu, Y., Green, T. J., Luo, M. and Zheng, X. (2010). Structure of human stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) reveals a saccharidebinding cleft with lower sugar-binding selectivity. *J Biol Chem*. no. 285, pp. 39898-39904.
3. Shao, R., Hamel, K., Petersen, L., Cao, Q. J., Arenas, R. B., Bigelow, C., et al. (2009). YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene*, no. 28, pp. 4456–4468.
4. Litviakov N. V., Cherdyntseva N. V., Tsyganov M. M., Slonimskaya E. M., Ibragimova M. K., Kazantseva P. V., Kzhyshkowska J., Choinzonov E. L. (2016). Deletions of multidrug resistance gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget*, no. 7, pp. 7829-7841.
5. Jensen, B. V., Johansen, J. S., and Price, P. A. (2003). High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, no. 9, pp. 4423–4434.

**АЦЕТОНОБУТИЛОВОЕ СБРАЖИВАНИЕ ГИДРОЛИЗАТОВ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ
С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ БИОБУТАНОЛА**

Т.С. Морозова

Научный руководитель: доцент, к.б.н. С.Ю. Семёнов

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

E-mail: Tsmorozova1991@gmail.com

**ACETONE-BUTANOL FERMENTATION OF LIGNOCELLULOSIC HYDROLYSATES FOR THE
BUTANOL PRODUCTION**

T.S. Morozova

Scientific Supervisor : Assistant professor, Ph.D. S.Yu. Semyonov

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

E-mail: Tsmorozova1991@gmail.com

Abstract. *In the present study, we evaluated of the use of lignocellulosic hydrolysates for the biobutanol production. We used an acid hydrolysate of spruce and an enzymatic hydrolysate of miscanthus cellulose. The obtained results confirmed the efficacy of the hydrolysates as sources of reducing substances. For the most successful application of the lignocellulosic hydrolysates for biobutanol production, it is necessary to apply an inexpensive and effective detoxification method and to use of cost-effective growth factors.*

Введение. Биобутанол – это альтернативное моторное топливо, получаемое путем сбраживания углеводсодержащих сред ацетонобутиловыми бактериями рода *Clostridium*. Он обладает рядом экологических и энергетических преимуществ в сравнении с биоэтанолом и бензином, однако, при использовании пищевого сырья для приготовления сбраживаемых сред, заметно проигрывает им в себестоимости [1]. Значительно снизить затраты на производство биобутанола позволяет использование в качестве источника углеводов гидролизатов лигноцеллюлозного сырья (ЛЦС) – отходов АПК и лесного хозяйства.

Несмотря на явное преимущество применения гидролизованных лигноцеллюлозных отходов как источников редуцирующих веществ, возникают проблемы на стадии подготовки сбраживаемых сред, связанные с токсичностью гидролизатов для продуцентов биобутанола и с отсутствием в них ростовых веществ, необходимых для биоагентов брожения. Эффективное решение данных проблем позволит успешно применять гидролизаты ЛЦС в технологиях получения биобутанола.

Целью работы являлась оценка эффективности ацетонобутилового сбраживания гидролизатов лигноцеллюлозного сырья в бутанол.

Материалы и методы исследования. Ацетонобутиловое брожение осуществлялось штаммом бактерий *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, полученным из ВКПМ. Данный штамм рода клостридий является одним из наиболее изученных штаммов, образующих растворители [2], обладает сахаролитической, амилолитической и протеолитической способностями [3].

В качестве источников редуцирующих веществ использовались кислотный гидролизат еловых опилок, содержащий 22,3 г/л глюкозы, 15,6 г/л маннозы и 7,9 г/л ксилозы, и ферментативный гидролизат целлюлозы мискантуса, включающий в себя 34,8 г/л глюкозы и 1,3 г/л ксилозы.

Детоксикация гидролизатов ЛЦС осуществлялась специально адаптированным активным илом, по методике, приведенной в [4]. Источником ростовых веществ выступал отжим с пивной дробины в количестве 6 об. %, в качестве контрольного варианта – факторы роста из полусинтетической среды, прописанной в паспорте культуры *C. acetobutylicum* ATCC 824 [г/л]: ПАБК – 0,001, тиамин – 0,001, биотин – 0,001, цистеин – 0,5, дрожжевой экстракт – 1.

В качестве контрольных сред были приготовлены 6 % кукурузный затор, полусинтетическая среда с содержанием глюкозы 20 г/л и среда, содержащая 45 г/л глюкозы и 6 об. % отжима с пивной дробины. Также для дополнительно контроля были приготовлены аналогичные среды с неочищенными гидролизатами ЛЦС. Стерилизацию кукурузного затора проводили при 0,2 МПа в течение 2 часов, остальных сред – при 0,15 МПа в течение 20 минут. Брожение осуществлялось при 37 °С.

Процесс ферментации оценивался визуально по времени начала, окончания и интенсивности газовыделения и пенообразования, а также по содержанию целевых продуктов. Концентрации бутанола, ацетона и этанола в отбродившей среде определялись на газовом хроматографе Хроматэк-Кристалл. 5000.2 (Россия).

Результаты и обсуждение. На первом этапе работ осуществлялось сбраживание очищенных гидролизатов ЛЦС с добавлением ростовых веществ по составу и концентрациям как в стандартной полусинтетической среде. В качестве контроля сбраживалась полусинтетическая среда. Для инокуляции образцов применяли музейную культуру, хранившуюся на полусинтетической среде, прописанной в ее паспорте. В опытах по сбраживанию гидролизатов во всех 16 повторностях брожение шло нормально, характеризовалось интенсивными процессами газовыделения и пенообразования. Однако брожение сред на основе обоих гидролизатов началось с задержкой – на 10–12 ч., окончание брожения было отмечено на 79–83 ч. В контрольном варианте начало брожения отмечено на 7–8 ч., а окончание – на 72–74 ч. По завершении брожения суммарный выход растворителей в опыте с гидролизатом мискантуса составил 15,4 г/л, с гидролизатом опилок ели – 16,2 г/л, в контрольном варианте – 17,7 г/л. При этом в последующих посевах, когда использовали инокулят из отбродивших сред на основе гидролизатов, суммарный выход растворителей в опытах повысился примерно в 1,2 раза (табл. 1); время начала и окончания брожения сократилось на 3–4 ч. Был сделан вывод, что культуре бактерий *C. acetobutylicum* ATCC 824 требуется адаптация к новым источникам редуцирующих веществ, после которой эффективность потребления субстратов повышается.

Далее оценивалась эффективность сбраживания гидролизатов ЛЦС, когда в качестве недорогого источника ростовых веществ используется отжим с пивной дробины. В контрольном варианте в качестве редуцирующего вещества выступала глюкоза. Начало брожения во всех случаях было отмечено через 8–10 ч., завершение – через 72–79 ч. Суммарный выход растворителей в опытных и контрольных образцах был примерно одинаковым (табл. 1), что говорит о возможности эффективного применения отжима с пивной дробины в качестве источника ростовых веществ.

Во всех контрольных вариантах с неочищенными гидролизатами брожение отсутствовало. В результате сбраживания мучной среды суммарный выход растворителей в среднем составил 20,6 г/л.

(табл. 1). Брожение характеризовалось интенсивными процессами газовыделения и пенообразования. Начало отмечено на 7–8 ч., окончание на 72–73 ч. Более высокий выход растворителей в сравнении с опытными образцами, по нашему мнению, объясняется высоким содержанием в кукурузном заторе, помимо сахаров, крахмала. Поскольку клостридии обладают явно выраженной амилолитической способностью, то они используют в качестве источника углерода обе группы соединений. При этом выход растворителей в данном варианте достиг максимума, после которого начинается бутаноловое ингибирование продуцентов.

Таблица 1

Средние результаты ацетонобутилового сбраживания различных сред бактериями *C. acetobutylicum* ATCC 824

Среда	Время брожения, ч.		Средний выход растворителей, [г/л]		
	Начало	Окончание	Бутанол	Ацетон	Этанол
Гидролизат опилок ели + компоненты полусинтетической среды	7–8	75–79	15,3±0,8	2,8±0,5	1,4±0,3
Гидролизат мискантуса + компоненты полусинтетической среды	7–9	75–78	14,1±1,4	2,2±0,6	1,0±0,4
Полусинтетическая среда	7–8	72–74	14,5±1,1	2,8±0,9	1,1±0,4
Гидролизат опилок ели + отжим с пивной дробины	8–10	72–79	15,1±0,7	2,4±0,2	1,4±0,4
Гидролизат мискантуса + отжим с пивной дробины	8–10	72–79	14,9±0,8	3,1±0,6	0,9±0,2
Глюкоза + отжим с пивной дробины	8–10	72–79	15,5±0,9	2,9±0,7	1,1±0,2
Кукурузный затор	7–8	72–73	17,2±0,3	3,2±1,3	1,3±0,8

Вывод. Полученные в ходе исследования результаты подтвердили возможность эффективного применения гидролизатов ЛЦС для получения биобутанола. При их сбраживании выход целевых продуктов был несколько ниже, чем при использовании кукурузной муки, вследствие чего затраты на перегонку могут незначительно повыситься. Для снижения этих затрат можно повысить выход растворителей при сбраживании сред на основе гидролизатов ЛЦС путем увеличения содержания в них редуцирующих веществ до предельной концентрации 6 %. Применение малозатратного способа детоксикации гидролизатов и использование недорогих источников ростовых веществ позволит еще более эффективно применять гидролизаты ЛЦС в технологиях ацетонобутилового производства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shapovalov O.I., Ashkinazi L.A. Biobutanol: Biofuel of Second Generation // Russian Journal of Applied Chemistry. – 2008. – Vol. 81. – № 12. – P. 2232–2236.
2. Croux Ch., Canard B., Goma G. Autolysis of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // Journal of General Microbiology. – 1992. – Vol. 138. – P. 861–869.
3. Логоткин И.С. Технологии ацетон-бутилового производства. М. : Пищепромиздат, 1958. – 254 с.
4. Morozova, T. S., Semyonov, S.Y. Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Biobutanol Production // Key Engineering Materials. – 2016. – Vol. 683 – P. 525–530.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ К КОМПОНЕНТАМ АКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ

В.В. Нелубова, М.Д. Рыкунова, Э.К. Калатози

Научный руководитель: профессор, д.т.н. В.В. Строкова

Белгородский государственный технологический университет им. В.Г. Шухова,

Россия, г. Белгород, ул. Костюкова, 46, 308012

E-mail: nelubova@list.ru

SENSIBILITY OF MOLD FUNGI TO REACTIVE COMPONENTS

V.V. Nelubova, M.D. Rykunova, E.K. Kalatozi

Scientific Supervisor: V.V. Strokova, Professor, PhD

Belgorod State Technological University named after V.G. Shoukhov

308012, Russia, Belgorod, Kostukov St., 46

E-mail: nelubova@list.ru

Abstract. *In the paper the sensibility of different types of mold fungi to differently oriented reactive components is presented. A high funginertness of oxalaldehyde based disinfectants is established. Biodegradability of a polyhexamethyleneguanidine based bactericidal agent is studied.*

Введение. Низшие организмы постоянно и повсеместно обитают в среде пребывания человека, используя в качестве питательного субстрата органические и неорганические соединения [1]. Биозаражение конструкций и зданий ведет к нарушению устойчивого состояния окружающей среды, вследствие чего отмечается рост разнообразия и численности патогенных микроорганизмов [2–4]. При этом существенная профилизация отдельных регионов страны на сельскохозяйственную промышленность, а также развитие технологий альтернативных видов энергии, в том числе получаемых с использованием биотехнологий, выводит обозначенные проблемы на новый уровень.

На сегодняшний день самым распространенным и доступным методом борьбы с развитием микробиоценоза и патогенной микрофлоры на поверхностном уровне является применение специальных активных соединений – биоцидов. При этом объемы выпуска эффективных экологически безопасных биоцидов растут ежегодно, что связано, прежде всего, с прогрессирующим ростом количества устойчивых штаммов по отношению к ним. Тем не менее, резистентность патогенных микроорганизмов представляет серьезную проблему и влияет прямым образом на эффективность санитарно-гигиенических мероприятий. Стоит отметить, что вещества активного действия, применение которых обусловлено необходимостью ликвидации последствий функционирования конкретного биодеструктора-технофила, как правило, оказывают комплексное действие, воздействуя на сформированный микробиоценоз в совокупности. Целью настоящей работы является изучение способности веществ активного действия, входящих в различные группы по назначению, сопротивляться воздействию плесневых грибов, т.е. их грибостойкость или фунгицидность.

Материалы и методы исследования. В качестве тестируемых веществ использовали дезинфицирующее средство «Диновис» производства ЗАО «Альдомед» (г. Томск) и добавку

бактерицидную «БиоПласт» производства ООО «Полипласт Новомосковск» (г. Новомосковск). «Диновис» представляет собой водный концентрат, содержащий глиоксаль, алкилдиметилбензиламмоний хлорид, 2-метилимидазол, функциональные компоненты. «БиоПласт» характеризуется наличием в своем составе полигексаметилгуанидин гидрохлорида и алкилбензилдиметиламмоний хлорида.

Исследование стойкости микромицетов к активным компонентам проводили с помощью диско-диффузионного метода согласно МУК 4.2. 1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Для этого были использованы плесневые тест-культуры родов *Aspergillus niger* van Tieghem, *Aspergillus terreus* Thorn, *Chaetomium globosum* Kunze, *Paecilomyces varioti* Bainier, *Penicillium cyclopium* WestlIng, *Penicillium Purpureo*. В качестве твердой питательной среды была использована среда Чапека Докса. Полученная среда была разлита в стерилизованные чаши Петри, в количестве 20 мл на каждую чашу и подсушена в течение часа. По застыванию питательной среды, споры тест-культур были высеяны на поверхность чаш с помощью шпателя Дригальского, еще раз подсушены и уже на зараженную поверхность были опущены диски, выдержанные в различных концентрациях биоцидных препаратов. В качестве дисков использовалась фильтровальная бумага диаметром 2 см, перед использованием диски были простерилизованы ультрафиолетовым излучением. Чаши Петри с исследуемыми образцами хранились в естественных условиях в течение двух недель при комнатной температуре с доступом света.

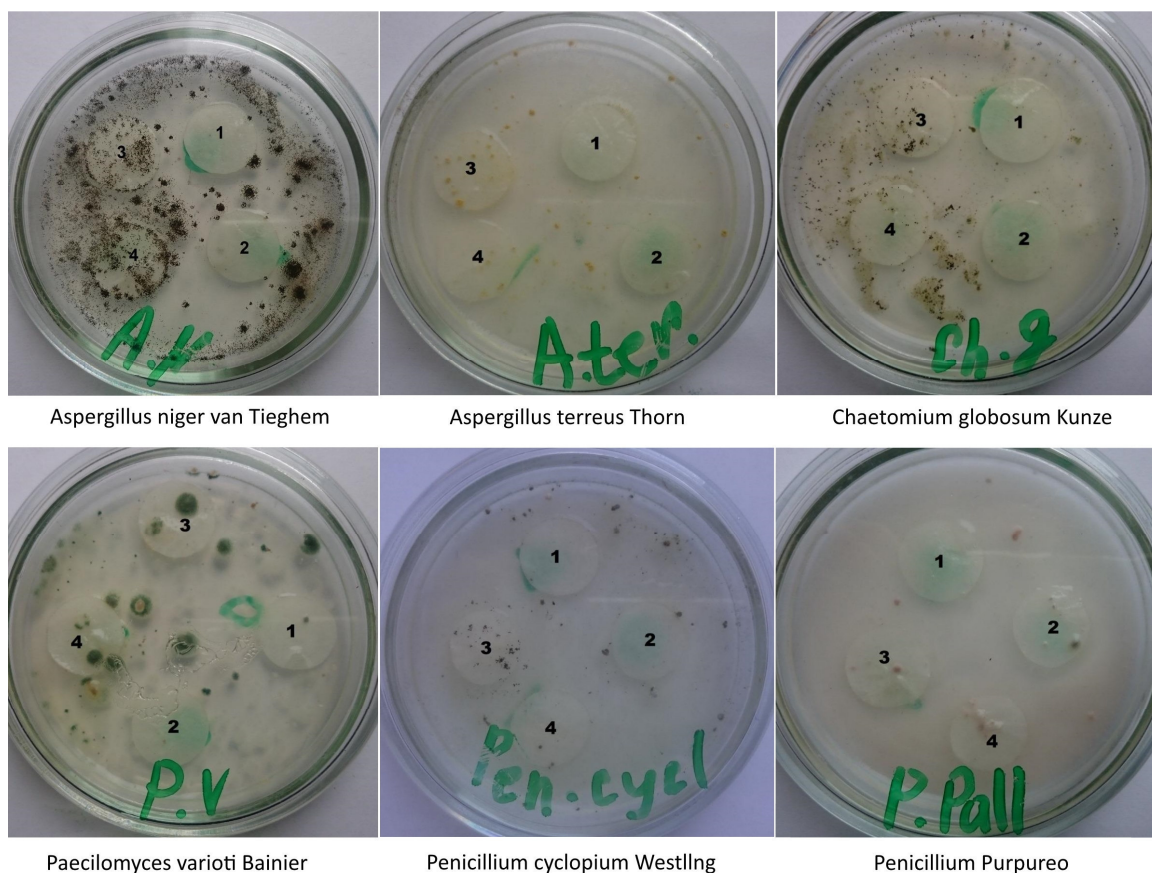


Рис. 1. Чувствительности тест-культур мицелиальных грибов по отношению к активным веществам:

1 – «Диновис» рабочая концентрация; 2 – «Диновис» малая концентрация;

3 – «БиоПласт» малая концентрация; 4 – «БиоПласт» рабочая концентрация

Результаты. Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о высокой биостойкости дезинфицирующего средства «Диновис». При этом в отношении ряда мицелиальных объектов вещество выступает активным фунгицидом, проявляя фунгистатическую активность – препятствует росту культуры по объему чаши. При этом в отношении грибов вида *Penicillium* отмечается практически полное отсутствие тенденции к росту. Это связано с наличием высокоактивного комплекса целлюлитических ферментов в составе мицелия, содержание которых в составе активных веществ не фиксируется. Существенное обрастание образцов с «БиоПластом» грибами *Aspergillus niger van Tieghem*, объясняется, вероятно, тем, что эти представители являются мощными продуцентами эстеров.

Заключение. Таким образом, дезинфицирующее средство «Диновис» является биостойким компонентом, тогда как бактерицидная добавка «БиоПласт», согласно полученным данным, является биоразлагаемой. Однако, в рамках настоящего исследования оценка устойчивости (или чувствительности) производилась на основе данных по влиянию биоцидных компонентов различного действия на отдельные культуры. При этом при функционировании композитов микробиоценоз всегда представлен совокупностью видового разнообразия, что существенно усложняет оценку качества активных в отношении микроорганизмов веществ. Это обусловлено отличием свойств композиции микромицетов в зависимости от состава и соотношения составляющих, однако, анализ степени воздействия биоактивных компонентов на устойчивость «диких» микромицетов станет одной из задач дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме государственного задания Минобрнауки России, проект 7.872.2017/ПЧ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соломатов В.И., Ерофеев В.Т., Смирнов В.Ф., Семичева А.С., Морозов Е.А. Биологическое сопротивление материалов: монография. – Саранск: Изд-во Мордов. Ун-та, 2001. – 196 с.
2. Строкова В.В., Баскаков П.С., Мальцева К.П. Стабилизация наноразмерных частиц серебра для условий работы в составе водно-дисперсионных лакокрасочных материалов // Вестник Белгородского государственного технологического университета им. В.Г. Шухова. – 2016. – № 4. – С. 84–88.
3. Строкова В.В., Баскаков П.С., Мальцева К.П. Разработка эмали с устойчивым наноразмерным серебром для отделки цементно-известковых штукатурок // Техника и технология силикатов. – 2016. – Т. 23. – № 3. – С. 14–20.
4. Строкова В.В., Баскаков П.С., Мальцева К.П. Уточнение методики расчета критической объемной концентрации пигментов в составе лакокрасочных материалов // Вестник Белгородского государственного технологического университета им. В.Г. Шухова. – 2015. – № 6. – С. 144–148.

**АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *DRD2* И *DRD3* С РАЗВИТИЕМ
НЕЙРОЛЕПТИЧЕСКОЙ ГИПЕРПРОЛАКТИНЕМИИ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ**

Д.З. Османова^{1,2}, И.В. Пожидаев^{1,2}, А.С. Бойко¹

Научные руководители: профессор, д.м.н. С.А. Иванова¹, профессор, д.б.н. В.Н. Стегний²

¹«НИИ Психического Здоровья» Томский НИМЦ, Россия, г. Томск, ул. Алеутская 4, 634014

²Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

E-mail: osmanovadiana@mail.ru

**ASSOCIATION OF POLYMORPHIC VARIANTS OF *DRD2* AND *DRD3* GENES WITH
DEVELOPMENT OF NEUROLEPTIC HYPERPROLACTINEMIA
IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA**

D.Z. Osmanova^{1,2}, I.V. Pozhidaev^{1,2}, A.S. Boyko¹

Scientific Supervisor: Prof., M.D. S.A. Ivanova¹, Prof. Doctor of Sc. V.N. Stegnyy²

¹"Mental Health Research Institute", Tomsk National Research Medical Center,

Russia, Tomsk, Aleutskaya st., 4, 634014

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

E-mail: osmanovadiana@mail.ru

Abstract. Hyperprolactinemia is a classical side effect of antipsychotic drugs primarily attributed to blockade of dopamine receptors in the pituitary gland. We describe the association between hyperprolactinemia and a set of SNPs from *DRD2* and *DRD3* receptor genes in a population of 173 patients with a clinical diagnosis of schizophrenia (according to ICD-10:F20) who were treated with classical and/or atypical antipsychotic drugs. Significant associations were established between two polymorphic variants (rs6277, rs2734849) of *DRD2* gene and hyperprolactinemia. Subject to further replication, our findings extend the available knowledge on the pharmacogenetics of hyperprolactinemia and neurotransmitter receptors.

Введение. Антипсихотические препараты могут вызывать разнообразные нежелательные лекарственные реакции, снижающие приверженность больных к лечению, требующие замены лекарственного средства или назначения корректирующих средств, что повышает стоимость лечения, и в целом затрудняет продолжение антипсихотической терапии [1]. Гиперпролактинемия относится к наиболее характерным эндокринным побочным эффектам нейролептической терапии [2–4]. Большинство современных антипсихотических средств являются антагонистами D2–рецепторов и в результате их действия происходит снижение уровня гипоталамического дофамина, что может служить причиной повышения уровня пролактина у пациентов, получающих фармакотерапию.

При проведении терапии антипсихотиками гиперпролактинемия чаще встречается у женщин репродуктивного возраста, в 48–93% случаев. У мужчин частота встречаемости варьирует от 42 до 47% [4]. Вероятность развития гиперпролактинемии зависит от фармакологических свойств антипсихотика, его дозы, схемы и длительности приема, а также индивидуальной чувствительности [2,3]. Важная роль в развитии гиперпролактинемии принадлежит генетическим факторам, в частности полиморфным

особенностям генов, кодирующих гормон пролактин, ферменты системы цитохромов и нейромедиаторные рецепторы, которые являются мишенями действия антипсихотических препаратов [5-7].

В настоящем исследовании в качестве возможных генов-кандидатов на роль ответственных за особенности антипсихотического эффекта нейролептиков нами рассматривались полиморфные варианты генов дофаминовых рецепторов *DRD2* (*rs6277*, *rs134655*, *rs2283265*, *rs179997*, *rs6279*, *rs2734849*) и *DRD3* (*rs963468*, *rs167771*, *rs1587756*).

Материал и методы исследования. Выборка для исследования составила 173 пациента с диагнозом шизофрении в соответствии с диагностическими критериями МКБ–10 (F20). Определение содержания гормона пролактина в сыворотке крови проводилось иммуноферментным методом с использованием набора реагентов PRL Test System. Границы нормальных значений содержания гормона пролактина в крови: для мужчин – до 20 нг/мл, для женщин – до 25 нг/мл. Для выделения ДНК использовался стандартный фенол–хлороформный микрометод. Генотипирование проводилось с использованием The MassARRAY® Analyzer 4 by Agena Bioscience™, набором SEQUENOM iPLEX Gold 384.

Результаты. Исходя из полученных данных, о содержании гормона пролактина в сыворотке крови, все пациенты с шизофренией были разделены на две группы: с гиперпролактинемией и без гиперпролактинемии. При проведении сравнения частот генотипов полиморфных вариантов генов *DRD2* и *DRD3* между группами пациентов с гиперпролактинемией и без неё были выявлены статистически значимые результаты для полиморфных вариантов *rs2734849* ($\chi^2=5,921; p=0,052$) и *rs6277* гена *DRD2* (Таблица 1).

Таблица 1

Сравнение частот генотипов полиморфных вариантов гена *DRD2* между группами пациентов с гиперпролактинемией и пациентов без гиперпролактинемии

Ген	Генотипы	Пациенты с гиперпролактинемией	Пациенты без гиперпролактинемии	χ^2	p
<i>DRD2</i> (<i>rs6277</i>)	CC	24(27,3%)	29(34,1%)	5,290	0,071
	CT	39(44,3%)	44(51,8%)		
	TT	25(28,4%)	12(14,1%)		
<i>DRD2/ANKK1</i> (<i>rs2734849</i>)	CC	24(27,3%)	11(12,9%)	5,921	0,052
	CT	40(46,6%)	44(51,8%)		
	TT	23(26,1%)	30(35,3%)		

Аллель С по полиморфизму *rs2734849* гена *DRD2* является предрасполагающим к развитию гиперпролактинемии (OR 1,61; 95%CI: 1,05–2,47), а аллель Т статистически значимо реже встречается у больных с повышенным уровнем пролактина и обладает протективным свойством (OR 0,62; 95%CI: 0,40–0,95). В результате анализа ассоциаций исследуемых полиморфизмов было выявлено, что аллель Т полиморфного варианта *rs6277* гена *DRD2* статистически значимо чаще встречается у больных, чем в контроле, и может рассматриваться как ассоциированный с развитием гиперпролактинемии (OR 1,53; 95%CI: 1,00–2,35). Соответственно, генотип ТТ также может рассматриваться как предрасполагающий в отношении развития нейролептической гиперпролактинемии (OR 2,41; 95%CI: 1,12–5,20).

В результате сравнения частот генотипов полиморфных вариантов генов *DRD2 rs134655* ($\chi^2=0,316;p=0,854$), *rs2283265* ($\chi^2=3,685;p=0,158$), *rs179997* ($\chi^2=3,118;p=0,210$), *rs6279* ($\chi^2=0,337;p=0,845$) и *DRD3 rs963468* ($\chi^2=0,495;p=0,781$), *rs167771* ($\chi^2=3,879;p=0,144$), *rs1587756* ($\chi^2=0,293;p=0,864$) между группами пациентов с гиперпролактинемией и пациентов с нормальным уровнем пролактина, статистически значимых различий выявлено не было.

Выводы. Выявлены ассоциации двух полиморфных вариантов гена *DRD2* (*rs2734849*, *rs6277*) с развитием гиперпролактинемии у больных шизофренией на фоне антипсихотической терапии. Необходимо продолжение исследований для подтверждения роли гена дофаминового рецептора *DRD2* в развитии антипсихотик-индуцированной гиперпролактинемии и разработки персонализированных подходов к терапии на основе фармакогенетических данных.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-35-00023 «Лаборатория фармакогенетических исследований персонализированной терапии психических и нейродегенеративных расстройств»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванова С.А., Федоренко О.Ю., Смирнова Л.П., Семке А.В. Поиск биомаркеров и разработка фармакогенетических подходов к персонализированной терапии больных шизофренией // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2013. – №1 (76). – С. 12–17.
2. Ajmal, A., Joffe, H., Nachtigall, L. B. (2014) Psychotropic-induced hyperprolactinemia: a clinical review. *Psychosomatics*, no. 55, pp. 29–36.
3. Корнетова Е.Г., Иванова С.А., Семке А.В., Бородюк Ю.Н., Бойко А.С. Гиперпролактинемия как побочный эффект антипсихотической терапии больных шизофренией: Пособие для врачей. – Томск.: Иван Федоров, 2015. – 28 с.
4. Горобец Л.Н. Влияние терапии атипичными антипсихотиками на динамику уровня пролактина у больных шизофренией и шизоаффективными расстройствами // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 140. – № 12. – С. 667– 669.
5. Вялова Н.М., Иванов М.В., Иванова С.А., Бойко А.С., Бохан Н.А., Чомский А.И., Сосин Д.Н., Насырова Р.Ф. Ассоциации полиморфизмов генов *CYP2D6* и *HTR2C* с развитием гиперпролактинемии у больных шизофренией на фоне антипсихотической терапии // Обозрение психиатрии и медицинской психологии. – 2014. – №3. – С. 8–13.
6. Ivanova, S. A., Osmanova, D. Z., Freidin, M. B., Fedorenko, O. Y., Boiko, A. S., Pozhidaev, I. V., Semke, A. V., Bokhan, N. A., Agarkov, A. A., Wilffert, B., Loonen, A. J. (2016) Identification of 5-hydroxytryptamine receptor gene polymorphisms modulating hyperprolactinaemia in antipsychotic drug-treated patients with schizophrenia. *The World Journal of Biological Psychiatry*, pp.1–8.
7. Ivanova, S. A., Osmanova, D. Z., Boiko, A. S., Pozhidaev, I. V., Freidin, M. B., Fedorenko, O. Y., Semke, A. V., Bokhan, N. A., Kornetova, E. G., Rakhmazova, L. D., Wilffert, B., Loonen, A. J. (2016) Prolactin gene polymorphism (-1149 G/T) is associated with hyperprolactinemia in patients with schizophrenia treated with antipsychotics. *Schizophrenia Research*, pp.1–5.

РЕАКЦИЯ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК НА ЭМФИЗЕМУ ЛЕГКИХ

Э.С.Пан, В.А. Крупин

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

НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Российская Федерация, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634028

E-mail: artifexpan@gmail.com

RESPONSE OF STEM AND PROGENITOR CELLS ON EMPHYSEMA

E.S.Pan, V.A. Krupin

Goldberg research institute of pharmacology and regenerative medicine, Russian federation, Tomsk, Lenin
prospect 3, 634028.

E-mail: artifexpan@gmail.com

Abstract. We studied inflammation, proteins of extracellular matrix, stem and progenitor cells from female C57Bl/6 mice on the model of elastase-induced emphysema. It was shown that diffuse emphysema reduces the amount of endothelial (CD45-CD31+ CD34+) and epithelial cells (CD45-CD117+CD49f+), the area of the connective tissue, causes a disturbance of microcirculation. The pulmonary emphysema is accompanied by infiltration of macrophages and lymphocytes in alveolar septum. Simultaneously with inflammation in the lung we observed an increase of the count of multipotentmesenchymal stromal cells (CD45-CD90+CD73+CD106+CD44+) and overexpression of extracellular matrix proteins (hydroxyproline, connective tissue growth factor, collagen, fibronectin), Clara cell protein and Clara cells (CD45-CD34-CD31-Sca1+). On the contrary elastase reduces the count of angiogenesis progenitor (CD45-CD117+ Flk1+).

Введение. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) представляет собой многофакторное заболевание легких, приводящее к тяжелым нарушениям функции дыхания. В основе прогрессирующей потери альвеолярной паренхимы при ХОБЛ лежит эмфизематозное расширение бронхиол и воспаление дыхательных путей [1]. Распространенность ХОБЛ очень высока [2]. Во многом заболевание связано с вдыханием вредных внешних агентов, хроническое и прогрессирующее течение характерно для пожилых людей (преимущественно у мужчин) [2, 3]. Наконец, для ХОБЛ отмечают повышенный риск развития рака [4].

Для ХОБЛ отмечается важность не только апоптоза альвеолярного эпителия и микрососудистых осложнений, но и недостаточной активности синтеза коллагена фибробластами [5]. Несмотря на достаточно большое количество экспериментальных и клинических исследований понимание патогенеза ХОБЛ ограничено, эффективных подходов лечения заболевания нет.

Восстановление структуры и функций многих тканей при патологии не обходится без участия биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (квалификационный сертификат имеется). Исследование одобрено Комитетом по контролю за использованием и содержанием лабораторных животных НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

Мышей делили на 2 группы. В 1-ю группу вошли мыши, находившиеся в естественных условиях (интактный контроль, n=20); во 2-ю группу – животные эмфиземой легких (n=40). Эмфизему легких моделировали однократным интратрахеальным введением эластазы (Sigma, США) в дозе 0.6 Е/мышь в 30 мкл. NaCl 0,9% [7]. День операции приняли за 0 день эксперимента. Мышей выводили из эксперимента на 7 и 14 сутки эксперимента передозировкой CO₂. тканеспецифичных стволовых и

прогениторных клеток [6]. Однако при ХОБЛ вопрос регенерации эндотелия и эпителия, восполнения матриксных белков с участием соответствующих тканеспецифичных стволовых и прогениторных клеток мало изучен.

Целью настоящего исследования явилось изучение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, предшественников гемангиогенеза и клеток Клара легких при моделировании эмфиземы легких.

Материал и методы исследования. Эксперименты выполнены на 7-8-недельных мышах-самках линии C57Bl/6 (n=60). Животные получены из питомника отдела.

Для гистологического исследования легких по стандартной методике готовили парафиновые блоки. Получали срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином для изучения содержания лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов и по Ван-Гизону на соединительную ткань.

Иммуноферментным анализом (ИФА) исследовались коллаген, гидроксипролин, фибронектин, фактор роста соединительной ткани, протеин клеток Клара в гомогенате легкого (согласно инструкции производителя (CusabioBiotech CO., LTD, Китай).

Экспрессию мембранных рецепторов моноклеаров анализировали с использованием мышинных моноклональных антител методом проточной цитофлуориметрии. Для анализа использовали прибор FACS Canto II с программным обеспечением FACS Diva («BD Biosciences», США). В легких изучали содержание мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (MMCK - CD45⁻CD90⁺CD73⁺CD106⁺CD44⁺), клеток Клара (CD45⁻CD34⁺CD31⁺Sca1⁺), клеток-предшественников ангиогенеза (CD45⁻CD117⁺Flk1⁺), эпителиальных клеток (CD45⁻CD117⁺CD49f⁺), эндотелиальных клеток (CD45⁻CD31⁺CD34⁺).

Результаты. В ходе проведенных экспериментов выявлено, что эластаза истончала стенки альвеол и бронхиол, значительно увеличивала площадь просвета, вызывала разрывы альвеолярных стенок. Оценка поверхностных маркеров выявила снижение количества эпителиальных клеток (CD45⁻CD117⁺CD49f⁺) до 27% (P<0,05) относительно интактного контроля. Дополнительно на гистологических препаратах обнаружены умеренная гиперемия капилляров межальвеолярных перегородок и нарушение микроциркуляции. Эмфизематозным изменениям в легких сопутствует инфильтрация макрофагами и лимфоцитами альвеолярных перегородок. С другой стороны, в эластазных легких площадь соединительной ткани уменьшалась более чем в 3 раза (P<0,05) по сравнению с интактным контролем на 7 и 14-е сутки.

Регенерация клеток и тканей не обходится без участия костномозговых, циркулирующих в крови и тканеспецифичных стволовых и прогениторных клеток. В эмфизематозных легких на фоне уменьшения числа клеток эпителия число клеток Клара увеличивалось (в 2,7 раза, P<0,05) по отношению к интактному контролю, одновременно регистрировался высокий уровень секретируемого клетками Клара белка (CCSP – Clara Cell Secretory Protein).

В эмфизематозных легких обнаружено уменьшение количества клеток-предшественников ангиогенеза и эндотелиальных клеток. Источником матриксных белков в легких выступают фибробласты. В свою очередь, MMCK, дифференцируясь, пополняют популяцию фибробластов в легких [6]. В эмфизематозно расширенных легких количество MMCK увеличивалось (7-е сутки), возрастала концентрация гидроксипролина и фактора роста соединительной ткани, коллагена и фибронектина (7,

14-е сутки).

Заключение. Результатом действия эластазы явились деструктивные изменения альвеолярных стенок, характерные для диффузной эмфиземы. Патологические изменения затронули микроциркуляцию и соединительную ткань. Одновременно с развитием эмфиземы регистрируется воспаление: легкие инфильтрируются лимфоцитами, макрофагами и нейтрофилами. Одновременно с увеличением количества ММСК и гиперэкспрессией белков внеклеточного матрикса регистрируется расширение популяции клеток Клара и повышение уровня, секретируемого клетками Клара белка, что является компенсаторной реакцией на разрушение соединительнотканного матрикса легких и уменьшение числа клеток эпителия. С другой стороны, эластаза сокращала популяцию клеток-предшественников ангиогенеза. С этой точки зрения, при моделировании эмфиземы воспалительная среда выступает негативным фактором для восстановления морфологических параметров легких, нарушается интеграция между стволовыми и прогениторными клетками, участвующими в регенерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hogg J.C., Timens W. (2009). The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu. Rev. Pathol.* pp. 435-459.
2. Rabe K. F., Hurd S., Anzueto A., Barnes P. J., Buist S. A., Calverley P., Fukuchi Y., Jenkins C., Rodriguez-Roisin R., van Weel C., Zielinski J. (2007). Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* no 176(6). pp. 532-555.
3. American Thoracic Society. (2000) Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* no. 161(2, Pt 1). pp. 646-664.
4. Koshiol J., Rotunno M., Consonni D., Pesatori A. C., De Matteis S., Goldstein A. M., Chaturvedi A. K., Wacholder S., Landi M. T., Lubin J. H., Caporaso N. E. (2009). Chronic obstructive pulmonary disease and altered risk of lung cancer in a population-based case-control study. *PLoS One.* no. 9 (4). pp. 1-7.
5. Chilosi M., Poletti V., Rossi A. (2012). The pathogenesis of COPD and IPF: Distinct horns of the same devil?. *Respiratory Research.* no. 13. doi: 10.1186/1465-9921-13-3
6. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Том 2 / Под ред. М. А. Пальцева. - М.: ОАО «Издательство «Медицина», издательство «Шико», 2009. - 456 с.
7. Lühje L., Raupach T., Michels H., Unsöld B., Hasenfuss G., Kögler H., Andreas S. (2009). Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. *Respiratory Research.* no. 10. doi: 10.1186/1465-9921-10-7.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ TAMARIX RAMOSISSIMA LEDEB.

Т.В. Пилипенко, О.В. Астафьева

Научный руководитель: профессор, д.б.н. М.А. Егоров

Астраханский государственный университет

Россия, Астрахань, Татищева 20а, 414056

E-mail: 79171987178@yandex.ru

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS OF TAMARIX RAMOSISSIMA LEDEB.

T.V. Pilipenko, O.V. Astafieva

Scientific Supervisor: Prof., Dr. M.A. Egorov

Astrakhan State University

Russia, Astrakhan, Tatischeva 20a, 414056

E-mail: 79171987178@yandex.ru

Abstract. Salt cedar (*Tamarix ramosissima* Ledeb.) forms thickets of treelike shrubs of the North-Western Caspian lowland and it is a powerful agent of process affecting the topography, soil and hydrological conditions, density of soils, as well as the structure of ecosystems and landscapes. The hallmark of the Astrakhan region is situated in the Volga Delta in the desert soil conditions. The objective of this work was to explore the antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of different parts of the plant *Tamarix ramosissima* *Tamarix* genus. The objective of the research was to determine the ability of extracts from various percentage content of phenolic substances, to perform free stable radical DPPH method. Inflorescences of the salt cedar have a comparative high rate of antioxidant activity equal to 35.6% of DPPH suppression. The most promising extracts of leaves and inflorescences of salt cedar at the level of absorption of the DPPH radical, which was a 25% ratio of water-alcohol extracts of the photosynthetic parts and 100% extracts of inflorescences *Tamarix ramosissima*.

Введение. Региональная флора аридных территорий является основой для изучения возможностей использования растений для получения биологически активных веществ. Один из таких перспективных видов – Тамарикс (*Tamarix ramosissima* Ledeb.), широко распространенный в Евразии, в т. ч. на юге России в Прикаспийской низменности, Африке и Северной Америке (как инвазивный вид) [1]. Некоторые авторы считают, что различные виды кустарников тамарикса (*Tamarix meyeri* Boiss., *Tamarix ramosissima* Ledeb.) образуют комплексы зарослей древовидных кустарников Северо-Западного Прикаспия и являются мощными агентами средообразовательного процесса, влияющего на рельеф поверхности, почвенно-гидрологические условия, плотность почвогрунтов, а также на структуру биогеоценозов и облик ландшафтов [2,3]. Известно, что тамарикс поглощает в почве не только NaCl, но и ионы Ca, Mg, K и др. [1]. В литературе обнаружены исследования химического состава тамарикса, где *Tamarix ramosissima* Ledeb. обнаруживает основное вещество – эвгенол (2-метокси-4-аллилфенол), являющееся производным фенола. Известно, что эвгенол входит в состав многих эфирных масел, в т. ч. гвоздичного, лаврового, базиликового, коричневого. Среди известной литературы не обнаружено сведений об антиокислительной (антиоксидантной) активности фенолсодержащих компонентов (биологическое активное вещество – эвгенол), выделенных и описанных в спиртовых экстрактах *Tamarix ramosissima*. [4].

Материалы и методы исследования Одним из способов оценки АОА является колориметрия свободных радикалов, основанная на реакции DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (C₁₈H₁₂N₅O₆, M = 394,33), растворенного в этаноле, с образцом антиоксиданта (АН). В результате восстановления DPPH антиоксидантом

снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в этаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 514 нм обычными методами спектрофотометрии [5].

Материалами для исследования были собранные в Приволжском районе во время вегетации фотосинтезирующие органы растения *Tamarix ramosissima* и соцветия, собранные во время цветения (май-июнь). Высушенные части растений измельчали, помещали в сосуды с водно-спиртовым раствором (40%) и водной средой в соотношении 1:5, 1:10. Экстракцию проводили при постоянном перемешивании, комнатной температуре, в течение 5-7 дней до полного насыщения растворителя. Затем растительный экстракт фракционировали в приборе Клевенджера.

Метод определения АОА. Приготовленные экстракты проходили через пастеризацию (при $T^{\circ}=85^{\circ}\text{C}$), концентрацию до получения экстракта в дозе активного вещества 10 мкг/мл в 100% водно-спиртовых экстрактах фотосинтезирующих частей и соцветий, 1мкг/мл в 100% водных экстрактах листьев тамарикса. В методе DPPH применялись экстракты фотосинтезирующих органов, соцветий тамарикса в 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, разведенных в этаноле для проведения реакции подавления DPPH. Исследование АОА в DPPH тесте проводили спектрофотометрическим методом со спиртовым раствором радикала DPPH при длине волны 517 нм. В результате статических испытаний измерения были проведены через 60 мин и затем были построены кривые зависимости % ингибирования радикалов DPPH от концентрации исходного антиоксиданта [6].

Результаты исследований. Одним из основных показателей, характеризующих антиоксидантную активность (АОА) по методу DPPH, является E_{C50} – концентрация экстракта антиоксиданта, при которой наблюдается 50%-ное ингибирование радикалов DPPH. Было определено условное значение E_{C50} , которое внесено в таблицы, характеризующие результаты подавления активности радикала DPPH, принимающего участие в перекисном окислении и разрушении мембранных липидов.

Результаты антиокислительной АОА водно-спиртовых экстрактов фотосинтезирующих частей растений *Tamarix ramosissima*, содержащих фенольные соединения (в том числе соединения эвгенола) по величине оптической плотности обесцвечивания DPPH и % подавления активности радикала показаны в таблице 1. В таблице отражены соотношения биологически активных фенолсодержащих веществ в экстрактах, разведенных этанолом различных концентрациях.

Таблица 1

Антиоксидантная активность (АОА) фенольных соединений водно-спиртовых экстрактов (40%) фотосинтезирующие органы растений T. ram.

Пробы	Величина ОП АОА	% подавления DPPH	E_{C50} мкг/мл
Контроль	1,687	2,05	0
Экстракт 100%	0,339	45,85	10
Экстракт 50%	0,422	38,00	5
Экстракт 25%	0,322	47,65	2,5
Экстракт 10%	0,694	20,25	1
Экстракт 5%	1,0675	8,55	0,5

Из представленных данных таблицы видно, что наибольшим поглощающим эффектом обладает экстракт фотосинтезирующих органов 25% *T. ramosissima*, содержащий (E_{C50}) 2,5 мкг/мл активного антиоксидантного компонента. Экстракты, содержащие 100%, 50% и другие соотношения фенольных соединений, обладали выраженной антиокислительной активностью в сравнении с контролем.

На основе проведенных экспериментальных работ охарактеризована поглощающая способность водных экстрактов фотосинтезирующих органов *Tamarix ramosissima* в различных соотношениях активного фенолсодержащего вещества в таблице 2.

Таблица 2

Антиоксидантная активность (АОА) фенольных соединений водных экстрактов фотосинтезирующих органов Tamarix ramosissima.

Пробы	Величина ОП АОА	% подавления DPPH	EC ₅₀ мкг/мл
Контроль	1,603	2,46	0
Экстракт 100%	0,482	32,76	1
Экстракт 50%	0,368	42,65	0,5
Экстракт 25%	0,576	26,4	0,25
Экстракт 10%	0,9705	10,8	0,1

Заключение. Проведенный анализ полученных результатов антиокислительной активности водных извлечений из фотосинтезирующих органов выявил наибольший процент подавления активности радикала DPPH в концентрации активного вещества 0,5 мкг/мл, но процент подавления составил всего 42,6. По нашему мнению, это связано с меньшей возможностью извлечения фенольных соединений при водной экстракции. Однако положительные данные результатов, сравнивая с полученными значениями, свидетельствуют о том, что водная экстракция высвобождает антиоксидантные компоненты из фотосинтезирующих органов *Tamarix ramosissima*.

Анализируя полученные экспериментальные данные, можно выявить наиболее перспективные варианты полученных экстрактов фотосинтезирующих органов и соцветий тамарикса по уровню поглощения радикалов DPPH, которыми оказались 25% соотношения водно-спиртовых экстрактов фотосинтезирующих органов и 100% экстракты соцветий *Tamarix ramosissima*. Такие показатели позволяют более детально изучить наличие и количественное соотношение биологически активных веществ (возможно фенольного содержания) с антиоксидантными и другими биологически активными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. В. Шуйская, М. П. Лебедева, А. В. Колесников, Т. И. Борисочкина, К. Н. Тодерич. Химический состав солей выделяемых тамариксом (*Tamarix ramosissima*), произрастающим в условиях различного засоления почв // Бюллетень Почвенного института им. В.В. Докучаева. 2016. Вып. 82.
2. Пилипенко В. Н. Современная флора дельты Волги: монография / В. Н. Пилипенко, С. Н. Перевалов. – Астрахань: Астраханский гос. ун-т, 2002. – 138 с.
3. Ясулбутаева И. В., Магомедов М. М.-Р. Биологическая активность почв экотонных сообществ тамариковых зарослей Северо-западного Прикаспия / Юг России: экология, развитие. – №2 – 2011 – С. 109-114
4. Афанасьев И. А. Хроматомасспектрометрические исследования экстракта вида *Tamarix ramosissima*, произрастающего в условиях астраханской области Афанасьев И. А. Международный журнал экспериментального образования №10, 2013. С.126-128.
5. Волков В. А., Дорофеев Н.А., Пахомов П.Н. Кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов растений/химико-фармацевтический журнал. Том 43, №6, 2009, С.27-31).
6. Астафьева О. В. Практические занятия блока «Выделение и изучение биологически активных компонентов» дисциплины «Общая биотехнология» //ИД «Астраханский университет», 2015

**ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СИСТЕМЫ
ЦИТОХРОМОВ P-450 И ГЕНА БЕЛКА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ С РАЗВИТИЕМ ЛЕКАРСТВЕННО-ИНДУЦИРОВАННОЙ
ГИПЕРПРОЛАКТИНЕМИИ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ**

И.В. Пожидаев^{1,2}, Е.Н Воронина³

Научные руководители: профессор, д.м.н. С.А. Иванова, профессор, д.б.н. В.Н. Стегний

¹ «НИИ Психического Здоровья» Томский НИМЦ,

Россия, г. Томск, ул. Алеутская 4, 634014

²Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева 8, 630090

E-mail: craig1408@yandex.ru

**A STUDY OF ASSOCIATIONS OF POLYMORPHIC VARIANTS OF CYTOCHROME P-450 SYSTEM
GENES AND MULTI-DRUG RESISTANCE GENE WITH THE DEVELOPMENT OF DRUG-
INDUCED HYPERPROLACTINEMIA IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA**

I.V. Pozhidaev^{1,2}, E.N. Voronina³

Scientific Supervisor: Prof., M.D. S.A. Ivanova, Prof. Doctor of Sc. V.N. Stegnyy

¹"Mental Health Research Institute", Tomsk National Research Medical Center,

Russia, Tomsk, Aleutskaya st., 4, 634014

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

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,

Russia, Novosibirsk, Lavrentiev av., 8, 630090

E-mail: craig1408@yandex.ru

Abstract. *The detection of clinical and biological associations in different alleles and genotypes allows to create the fundament for development methods, which help to identify risk of side-effects in patients with schizophrenia, who received long-term antipsychotics treatment. The aim of this study was to analyze the role of polymorphic variants of genes cytochrome P-450 system and multi-drug resistance gene (MDR1) in pathogenesis of drug-induced hyperprolactinemia in schizophrenia patients. In our research were detected statistically significant associations between polymorphic variants of multi-drug resistance gene and hyperprolactinemia which suggest this gene involvement in pathogenesis of this side-effect.*

Актуальность. В терапии шизофрении широко применяются антипсихотические препараты, которые наряду с антипсихотическим действием обладают спектром побочных эффектов [1]. Основное число побочных эффектов атипичных антипсихотиков при их длительном использовании реализуется по нейроэндокринному механизму [2,3]. Одним из распространенных побочных эффектов этих препаратов является гиперпролактинемия, которая существенно снижает качество жизни пациентов, а также требует замены лекарственного средства или назначения корректирующих средств, что в целом затрудняет

продолжение антипсихотической терапии. Причем, несмотря на достаточно широкий спектр возникающих при терапии антипсихотиками пролактин-ассоциированных побочных эффектов, представленность гиперпролактинемии в статусе больных далеко не всегда коррелирует с уровнем пролактина в крови [4]. В результате нами были выбраны, в качестве генов-кандидатов на роль ответственных за особенности антипсихотического эффекта нейролептиков, гены системы цитохромов P-450 *CYP1A2*, *CYP2D6*, *CYP2C19*, а также ген белка множественной лекарственной устойчивости *MDR1*.

Цель работы: исследование роли полиморфных вариантов генов системы цитохромов P-450 *CYP1A2*, *CYP2D6*, *CYP2C19* и гена белка множественной лекарственной устойчивости *MDR1* в патогенезе развития лекарственно-индуцированной гиперпролактинемии у пациентов с шизофренией.

Материалы и методы. Исследование проводили после получения информированного согласия: в исследование включили 446 пациентов, этнически русских, из них 225 женщин и 221 мужчина, средний возраст $42,1 \pm 1,4$ (от 18 до 77 лет включительно) с диагнозом параноидной шизофрении в соответствии с диагностическими критериями МКБ-10. ДНК выделяли из венозной крови стандартным фенол-хлороформным методом. Определение содержания гормона пролактина в сыворотке крови проводили иммуноферментным методом. Генотипирование по генам *CYP1A2*, *MDR1* проводилось в учреждении геномного анализа, лаборатории генетики университета Гронингена, с использованием The MassARRAY® System by Agena Bioscience™. Контрольные измерения концентрации ДНК производили на приборе Thermo Scientific NanoDrop 8000 UV-Vis Spectrophotometer. Генотипирование по генам *CYP2D6*, *CYP2C19* проводили на базе лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН г. Новосибирска.

Результаты. Все пациенты с шизофренией были разделены на две группы: с гиперпролактинемией (для женщин уровень пролактина должен быть более 25 нг/мл; для мужчин – более 20 нг/мл) и без гиперпролактинемии. Анализ генов системы цитохромов P-450 (*CYP1A2*1F*, *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4*, *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3*, *CYP2C19*17*) и белка множественной устойчивости *MDR1* показал, что наблюдаемое распределение генотипов для всех изучаемых генов соответствует ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга. Анализ частот генотипов пациентов с гиперпролактинемией и без неё по цитохромам *CYP1A2*1F* (rs206952: $\chi^2=1.326$, $p=0.249$; rs762551: $\chi^2=3.012$, $p=0.222$), *CYP2D6*3* (rs35742686: $\chi^2=0.263$, $p=0.608$), *CYP2D6*4* (rs3892097: $\chi^2=2.376$, $p=0.306$), *CYP2C19*3* (rs4986893: $\chi^2=0.482$, $p=0.487$), *CYP2C19*17* (rs12248560: $\chi^2=0.296$, $p=0.863$), *CYP2C19*2* (rs4244285: $\chi^2=0.023$, $p=0.988$) не выявил никаких статистически значимых результатов в пользу гипотезы принадлежности данных полиморфных вариантов к развитию гиперпролактинемии. Результат сравнительного частотного анализа для полиморфных вариантов гена белка множественной лекарственной устойчивости *MDR1* (rs1045642, rs2032582, rs4148739, rs28401781, rs2235040, rs9282564, rs2235015, rs2032583) представлен в таблице 1.

Таблица 1

Сравнение частот генотипов полиморфных вариантов гена белка множественной лекарственной устойчивости *MDR1*

Номер rs	Генотипы	Пациенты без ГП	Пациенты с ГП	χ^2	p
rs1045642	T/T	62	51	4.796	0.091
	T/C	106	102		
	C/C	31	48		

rs2032582	C/C	55	68	2.384	0.304
	C/A	99	97		
	A/A	45	36		
rs4148739	G/G	1	2	7.034	0.030
	G/A	30	51		
	A/A	168	148		
rs28401781	A/A	1	2	5.967	0.051
	A/G	25	43		
	G/G	173	156		
rs2235040	G/G	174	159	4.999	0.082
	G/A	24	40		
	A/A	1	2		
rs9282564	G/G	5	3	0.585	0.747
	G/A	48	47		
	A/A	146	151		
rs2235015	G/G	149	135	2.894	0.235
	G/T	46	61		
	T/T	4	5		
rs2032583	C/C	1	2	6.543	0.038
	C/T	25	44		
	T/T	173	155		

Выводы. Частотный анализ по генам системы цитохромов P-450 *CYP1A2*, *CYP2D6*, *CYP2C19* не выявил значимых ассоциаций с развитием гиперпролактинемии у пациентов. Для двух вариантов гена *MDR1* были получены статистически значимые результаты: для rs2032583 ($\chi^2=6.543$, $p=0.038$) и для rs4148739 ($\chi^2=7.034$, $p=0.030$), что позволяет предположить участие данного полиморфного варианта в развитии гиперпролактинемии у больных шизофренией.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-35-00023 «Лаборатория фармакогенетических исследований персонализированной терапии психических и нейродегенеративных расстройств».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Loonen, A. J. M., Ivanova, S. A. (2013). New insights into the mechanism of drug induced dyskinesia. *CNS Spectrums*, vol. 18, is. 01, pp. 15–20.
2. Буланов В.С. Коррекция эндокринных дисфункций на примере пациентов, длительно принимающих рисперидон // *Современные тенденции организации психиатрической помощи: клинические и социальные аспекты.* – Москва, 2004. – С. 211.
3. Корнетова Е.Г., Иванова С.А., Семке А.В., Бородюк Ю.Н., Бойко А.С. Гиперпролактинемия как побочный эффект антипсихотической терапии больных шизофренией: Пособие для врачей. – Томск, 2015. – 28 с.
4. Горобец Л. Н. Изменение массы тела у больных шизофренией и шизоаффектным расстройством в условиях длительной терапии атипичными антипсихотиками // *Журнал Неврологии и психиатрии.* – 2008. – № 9. – С. 52–56.

**THE ROLE OF CHEMOKINES IN THE RECRUITMENT OF PROGENITOR CELLS INTO THE
TUMOR NICHE IN PATIENTS WITH BREAST CANCER**

V. S. Poletika, L.A. Tashireva

Scientific Supervisor: Dr. O.E. Savelieva

Cancer Research Institute, Tomsk NRMС, Russia, Tomsk, 5th Kooperativny Str., 634050

E-mail: vpoletika@yandex.ru

**РОЛЬ ХЕМОКИНОВ В РЕКРУТИРОВАНИИ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В
ОПУХОЛЕВУЮ НИШУ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

В.С. Полетика, Л.А. Таширева

Научный руководитель: д-р мед. наук О. Е. Савельева

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

E-mail: vpoletika@yandex.ru

Аннотация. Развитие первичной опухоли сопровождается формированием опухолевой ниши, которая создает благоприятные условия для выживания и пролиферации раковых клеток. Одним из ключевых элементов эволюции опухолевой ниши является рекрутирование костномозговых клеток-предшественников, включая клетки-предшественники макрофагов, мезенхимальные стромальные клетки, эндотелиальные и гемопоэтические клетки-предшественники. Миграция упомянутых клеток в опухоль регулируется рядом хемокинов, в том числе CCL2, CXCL12, MSP (macrophage stimulating protein) и MIF (macrophage inhibitory factor). Целью настоящего исследования являлось изучение параметров опухолевой ниши при раке молочной железы. Исследование включало 24 больных с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы. В суспензии опухолевых клеток методом проточной цитофлюориметрии определяли содержание клеток-предшественников. Концентрацию хемокинов CCL2, CXCL12, MSP и MIF в венозной крови больных оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Достоверных различий в содержании исследованных клеточных популяций, а также концентрации изученных хемокинов между пациентами, разделенными на группы в зависимости от наличия или отсутствия лимфогенных метастазов и неoadъювантного лечения, обнаружено не было. В то же время, установлена прямая корреляционная связь между содержанием гемопоэтических клеток-предшественников в опухоли и концентрацией CXCL12 и MIF в крови.

Introduction. It is becoming more and more recognized that the progression of malignancies is largely determined by the dynamic interaction between tumor cells and cancer niche [1]. Similar to pre-metastatic niche that arises in the site of future metastasis, cancer niche is formed in the location of the primary tumor and provides hospitable environment for tumor growth and progression [2]. Evolution of the cancer niche accompanies the development of the primary tumor and implicates, along with activation of the stromal elements and secretion of chemokines and cytokines, the recruitment of bone marrow-derived progenitor cells including macrophage progenitor cells, mesenchymal stem cells (MSC), endothelial and hematopoietic progenitor cells (EPC, HPC) [1]. The signals that potentially control the recruitment of progenitor cells into the tumor include chemokines CCL2, CXCL12, MSP, and MIF [3–5]. Presumably, the development of the cancer niche not only

potentiates cancer cells survival and proliferation, but also enables some populations of malignant cells to acquire invasive and metastatic capabilities, therefore enhancing the malignant potential of the tumor [6]. In accordance with aforementioned data, the current study was aimed to investigate the parameters of the cancer niche in patients with invasive non-specific breast carcinoma, including the subpopulations of intratumoral progenitor cells and the concentrations of chemokines participating in the cancer niche formation, as well as to determine the connection of investigated parameters with the presence or absence of lymphogenic metastases and neoadjuvant treatment.

Materials and methods. The study included 24 patients with invasive breast carcinoma of no special type (T1-4N0-3M0) aged 36 to 68 years. Eight out of twenty-four patients received neoadjuvant treatment. Eleven patients were diagnosed with lymphogenic metastases, thirteen were free of any metastases. Cell suspensions were prepared from the breast tumor tissue through disaggregation using BD Medimachine System. The percentage of progenitor cells (CD34, CD133, CD90, VEGFR1, CD11b, CD45, CD202) in the acquired cell suspensions was measured with flow cytometry. Cells with CD34+ CD202+CD45–CD133+ phenotype were identified as endothelial progenitor cells, CD34–CD90+CD45– cells – as mesenchymal stem cells, CD34+ CD45+CD11b+ cells – as macrophage progenitor cells, and CD34+CD45+CD133–VEGFR1+ cells – as hematopoietic progenitor cells. The concentrations of CCL2, CXCL12, MSP, and MIF in the venous blood of patients were evaluated by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The presence of lymphogenic metastases was verified morphologically. The acquired results were statistically processed using Statistica 8.0 (Statsoft, 2007).

Results. Using the flow cytometry, the quantitative data on the subpopulation structure of progenitor cells in tumor tissue of patients with invasive breast carcinoma of no special type was obtained. In order to determine the connection between the investigated subpopulation structure and the presence or absence of lymphogenic metastases and neoadjuvant treatment, all patients were divided into groups accordingly. However, no statistically significant difference in the percentage of precursor cells between given groups was found (Table 1).

Table 1.

The subpopulations of progenitor cells in tumor in patients with invasive non-specific breast carcinoma, %.

	LM-	LM+	NAT-	NAT+
Hematopoietic progenitor cells	1,78 (0,92-4,56)	1,98 (1,66-3,21) $p_1 > 0,05$	2,38 (0,98-4,21)	1,8 (1,33-2,78) $p_2 > 0,05$
Endothelial progenitor cells	2,6 (1,84-4,16)	1,71 (0,29-1,87) $p_1 > 0,05$	2,56 (1,72-3,84)	1,78 (0,86-2,91) $p_2 > 0,05$
Macrophage progenitor cells	1,1 (0,71-2,19)	0,73 (0,73-1,85) $p_1 > 0,05$	0,96 (0,70-2,13)	1,29 (0,73-1,92) $p_2 > 0,05$
Mesenchymal stem cells	6,48 (3,04-17,09)	2,56 (0,01-7,14) $p_1 > 0,05$	6,33 (2,91-14,18)	4,85 (1,28-13,03) $p_2 > 0,05$

“LM-” – absence of lymphogenic metastases; “LM+” – presence of lymphogenic metastases. “NAT-” – absence of neoadjuvant chemotherapy; “NAT+” – presence of neoadjuvant chemotherapy. p_1 – significance of statistical difference in comparison to patients without lymphogenic metastases; p_2 – significance of statistical difference in comparison to patients without neoadjuvant chemotherapy.

The concentrations of chemokines participating in the formation of the cancer niche in patients with invasive breast carcinoma including CCL2, CXCL12, MSP, and MIF were determined. All four chemokines were expressed in the peripheral blood of 100% patients. There was no statistically significant difference in the concentrations of studied cytokines in patients depending on the presence or absence of lymphogenic metastases and neoadjuvant treatment. Nevertheless, a positive correlation between the percentage of hematopoietic progenitor cells in the tumor and the concentrations of chemokines CXCL12 and MIF in the peripheral blood was determined ($R=0,79$ and $0,8$, respectively; $p<0,05$ in both cases).

Conclusion. Taken together, it was shown that the cancer niche is represented by a set of hematopoietic, endothelial, and macrophage progenitor cells as well as mesenchymal stem cells, with varying ratios among patients. Concurrently, the chemokines CCL2, CXCL12, MSP, and MIF that are involved in the recruitment of all the investigated progenitor cells populations into the tumor, were registered in the blood samples of patients in 100% cases. Moreover, the positive correlation between the percentage of hematopoietic progenitor cells in tumor and the concentrations of CXCL12 and MIF in the peripheral blood was determined. Acquired results strongly support the existence of chemokine-mediated recruitment of progenitor cells into the primary tumor site. At the same time, no effect of the neoadjuvant chemotherapy on the process of cancer niche formation was identified.

REFERENCES

1. Barcellos-Hoff M. H., Lyden D., Wang T. C. (2013). The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, no. 13(7), pp. 511-518.
2. Kaplan R. N., Rafii S., Lyden D. (2006). Preparing the «soil»: the premetastatic niche. *Cancer Research*, no. 66(23), pp. 11089-93.
3. Turner M. D., Nedjai B., Hurst T., Pennington D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signaling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, no. 1843(11), pp. 2563-2582.
4. Guleng B., Tateishi K., Ohta M. et al. (2005). Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. *Cancer Research*, no. 65(13), pp. 5864-71.
5. Hass R., Otte A. (2012). Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment. *Cell Communication and Signaling*, no. 10(1):26.
6. Plaks V., Kong N., Werb Z. (2015). The cancer stem cells niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cell? *Cell Stem Cell*, no.16(3), pp. 225-238.

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ СИБИРСКИХ ВИДОВ *SAUSSUREA*

Я.Е. Решетов¹, М.Н. Шурупова², У.С. Пиримкулова¹

Научный руководитель: доцент, к.ф.н. Е.Ю. Авдеева

¹Сибирский государственный медицинский университет,

Россия, г. Томск, Московский тр., 2, 634055

E-mail: ferroplex2013@yandex.ru

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

E-mail: rita.shurupova@inbox.ru

PHENOLIC SUBSTANCES OF SOME SIBERIAN *SAUSSUREA* SPECIES

Ya.E. Reshetov¹, M.N. Shurupova², U.S. Pirimkulova¹

Scientific Supervisor: Ass. Prof., Dr. E.Yu. Avdeeva

¹Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt, 2, 634055

E-mail: ferroplex2013@yandex.ru

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

E-mail: rita.shurupova@inbox.ru

Abstract. Screening studies of phenolic compounds were made for seven Siberian *Saussurea* species DC.: *S. controversa* DC., *S. latifolia* Ledeb., *S. parviflora* (Poir.) DC., *S. frolovii* Ledeb., *S. amara* (L.) DC., *S. salicifolia* DC. и *S. davurica* Adams. All these plants contain aglycons and glycosides of flavonoids while quercetin and isoquercitrin are the most often found. Another 7 flavonoids are determined along with them in some of these species. Phenolic acids were detected in all samples with a predominance of coffee, chlorogenic and cinnamic acids. Esculetin and umbelliferone were identified in specimens of four different species.

Введение. Род *Saussurea* DC включает около 400 видов, произрастающих в Индии, Казахстане, Китае и Корее. Около 100 видов встречаются на территории Российской Федерации [1]. Представители этого рода имеют богатую историю применения в народной медицине Дальнего Востока, Сибири, Тибета, Монголии и Бурятии для лечения заболеваний дыхательной, пищеварительной и опорно-двигательной системы [2, 3, 4]. Широкий спектр биологической активности выявлен у *S. lappa* (Desne.) Clarke. [5], *S. costus* Falc.) Lipsch. [4] и *S. involucrata* (Kar. et Kir.) Sch. Bip. [3], используемых в традиционной медицине Тибета и Китая наравне с женьшенем. Виды *Saussurea* характеризуются содержанием разнообразных фенольных соединений, которые различными методами изучались у *S. medusa* Maxim. [6], *S. elegans* Ledeb. [7], *S. involucrata* [8]. Методом HPLC-DAD-ESI-MSn из *S. tridactyla* Sch.Bip. ex Hook.f. были получены 13 фенольных компонентов: гликозиды лютеолина, апигенина, кверцетина, кумарины и сирингин [9]. Многие виды *Saussurea* содержат флаволигнаны, и в частности, сирингин [3, 6, 10]. В надземной части *S. involucrata* из Казахстана методом ВЭЖХ выявлено высокое содержание галловой кислоты (7,24 %) и идентифицирован ряд сесквитерпеноидов, флавоноидов и фенолокислот [11]. Однако в целом, несмотря на перспективы применения в медицине, состав фенольных соединений сибирских видов *Saussurea* изучен недостаточно. Задачей нашего исследования был скрининг флавоноидов, фенолокислот и кумаринов 7 видов *Saussurea*, произрастающих в Сибири: *S.*

controversa DC., *S. latifolia* Ledeb., *S. parviflora*, *S. frolowii* Ledeb., *S. amara*, *S. salicifolia* и *S. davurica* Adams.

Материал и методы. Исследовали надземные органы семи видов *Saussurea*, собранные в фазу цветения в 2016 г. *S. controversa* (Красноярский край, окр. оз. Инголь; Хакасия, окр. с. Мендоль; Хакасия, окр. с. Ефремино), *S. latifolia* и *S. frolowii* (Хакасия, г. Орлиг-Тасхы), *S. parviflora* (Хакасия, г. Вершина Тургаюла), *S. amara* и *S. davurica* (Хакасия, окр. оз. Беле), *S. salicifolia* (Хакасия, окр. с. Ефремино). Воздушно-сухое сырье (влажность 7,0–9,3 %) экстрагировали 40 % этанолом при нагревании. После удаления этанола, часть экстракта последовательно экстрагировали хлороформом, этилацетатом и бутанолом. Экстракт (ЭЭ), хлороформную (ХФ), этилацетатную (ЭФ), бутанольную (БФ) фракции и водный остаток (ВФ) высушивали. Часть ЭФ, БФ и ВФ подвергали кислотному гидролизу при нагревании с 5 % раствором серной кислоты, в результате чего были получены гидролизаты соответствующих фракций: ГЭФ, ГБФ и ГВФ. Нативный экстракт использовали для проведения химических реакций, а фракции и их гидролизаты – для анализа методом бумажной хроматографии (БХ) на бумаге марки FN-4, FN-12 (Германия) и тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках «Silufol UV-254» (Чехия).

Результаты. Флавоноиды. Для обнаружения флавоноидов в ЭЭ проводили цианидиновую пробу по Брианту. Во фракциях методом БХ в системах уксусная кислота-вода: (15:85; 30:70; 60:40), детекторы – УФ-свет, 5 % этанольный раствор алюминия хлорида, проводили идентификацию с достоверными образцами (гиперозид, изокверцитрин, цинарозид, рутин, кверцетин, кемпферол, апигенин, мирицетин, байкалеин, лютеолин, дигидрокверцетин). Количественное определение флавоноидов в гидролизованных экстрактах проводили спектрофотометрическим методом по реакции комплексообразования с раствором алюминия хлорида в пересчете на кверцетин (λ 425 нм). По результатам качественных реакций и хроматографических исследований выявлено, что все растения содержат агликоны и гликозиды флавоноидов, в *S. frolowii* обнаружены антоцианы. Методом БХ во всех образцах обнаружен кверцетин и его гликозиды: изокверцитрин (*S. latifolia*, *S. frolowii*, *S. parviflora*, *S. controversa*, *S. salicifolia*), рутин (*S. frolowii*, *S. controversa*) и гиперозид (*S. controversa*, *S. salicifolia*). Апигенин (гликозиды) и лютеолин обнаружены в *S. latifolia*, *S. frolowii*, *S. amara* и *S. davurica*, в *S. parviflora* идентифицирован лютеолин. В 4 видах обнаружен кемпферол (*S. latifolia*, *S. parviflora*, *S. controversa*, *S. salicifolia*), в 3 видах – гликозиды мирицетина (*S. parviflora*, *S. controversa*, *S. amara*). Количество флавоноидов в указанных видах находилось в пределах от $0,11 \pm 0,04$ до $1,26 \pm 0,10$ %.

Фенолокислоты. Во фракциях методом БХ в системах уксусная кислота-вода: (5:95; 15:85), проводили идентификацию с достоверными образцами (коричная, галловая, анисовая, феруловая, фумаровая, кофейная, эллаговая, хлорогеновая, хинная кислоты). Количественное определение фенолокислот проводили в нативных экстрактах спектрофотометрическим методом в пересчете на кофейную кислоту (λ 330 нм). Во всех объектах были обнаружены фенолокислоты с преобладание кофейной, хлорогеновой и коричной кислот. В 5 видах (*S. latifolia*, *S. frolowii*, *S. amara*, *S. davurica*, *S. salicifolia*) идентифицирована феруловая кислота, в *S. frolowii* и *S. parviflora* – эллаговая, в *S. controversa* – галловая кислота. Количество фенолокислот в различных видах находилось в интервале от $0,81 \pm 0,12$ до $4,67 \pm 0,81$ %.

Кумарины. Во фракциях методом ТСХ в системах гексан-ацетон (1:1), гексан-ацетон-уксусная кислота(10:20:0,1) проводили идентификацию с достоверными образцами (эскулетин, умбеллиферон). Эскулетин был идентифицирован в *S. davurica*, *S. frolovii*, *S. amara*, *S. salicifolia* и *S. controversa*, а умбеллиферон – в *S. parviflora*, *S. amara*, *S. salicifolia* и *S. controversa*.

Закключение. Виды *Saussurea* накапливают в надземных частях разнообразные фенольные соединения. Полифенолы имеют многочисленные биологические эффекты и потенциал для использования при разработке новых лекарственных средств. Поэтому дальнейшее изучение структуры, физико-химических и фармакологических свойств этих соединений в растениях рода *Saussurea* позволит выявить вещества - молекулярные носители различных типов биологической активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Липшиц С.Ю. Род *Saussurea* DC. (Asteraceae). – Л.: Наука, 1979. – 283 с.
2. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae). СПб., Наука: 1993. – 352 с.
3. Chik, W., Zhu, L., Fan, L. L., Yi, T., Zhu, G. Y., Gou, X. J., Tang, Y. N., Xu, J., Yeung, W. P., Zhao, Z. Z., Yu, Z. L., & Chen, H. B. (2015). *Saussurea involucrata*: a review of the botany, phytochemistry and ethnopharmacology of a rare traditional herbal medicine. Journal of Ethnopharmacology, no. 172, pp. 44–60.
4. Pandey, M.M., Rastogi, S., & Rawat, A. K. S. (2007). *Saussurea costus*: botanical, chemical and pharmacological review of an ayurvedic medicinal plant. Journal of Ethnopharmacology, no. 110, pp. 379–390.
5. Zahara, K., Tabassum, S., Sabir, S., Arshad, M., Qureshi, R., Amjad, M. S., & Chaudhari, S. K. (2014). A review of therapeutic potential of *Saussurea lappa* – an endangered plant from Himalaya. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v. 7, pp. 60–69.
6. Fan, C. Q., & Yue, J. M. (2003). Biologically active phenols from *Saussurea medusa*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, no. 11, pp. 703–708.
7. Шамьянов И.Д., Батиров Э.Х., Юлдашев М.П., Маллабаев А. Компоненты *Saussurea elegans* // Химия природных соединений. – 1983. – Т. 6. – С. 796–797.
8. Lui, L., Xiao, X., Zhang, L., & Zheng, R. (1985). Effect of the flavones from *Saussurea involucrata* on DNA synthesis of cancer cells. Lanzhou Daxue Xuebao Ziran Kexue Ban, no. 21, pp. 80–83.
9. Dawa, Z., Zhou, Y., Bai, Y., Gesang, S., Bai, B., & Ding, L. (2008). Development of an HPLC-DAD-ESI-MSn method for quantitative analysis of *Saussurea tridactyla*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, no. 48, pp. 1076–1081.
10. Syrchina, A. I., Chernousova, A. V., Vereshchagin, A. L., & Semenov, A. A. (1993). Chemical composition of extractants of *Saussurea controversa*. Khimiya Prirodnikh Soedinenii, no. 29, pp. 686–687.
11. Жабаева А.Н., Итжанова Х.И., Курапова М.Ю., Эбель А.Л., Куприянов А.Н., Адекенов С.М. Изучение химического состава *Saussurea involucrata* Kar. et Kir., произрастающей на территории Казахстана // Фармация и фармакология. – 2014. – Т. 6, № 7. – С. 11–14.

**КОНСТИТУЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ В СТРУКТУРЕ ЭПИФИЗОВ ПЛЕЧЕВЫХ И
БЕДРЕННЫХ КОСТЕЙ МУЖЧИН**

Р.В. Рябоконь, Н.В. Кошелев, Т.Э. Махмудов

Научный руководитель: профессор, д.м.н. Н.Н. Медведева

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого,

Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1, 660022

E-mail: r-ryabokon@mail.ru

**CONSTITUTIONAL FEATURES OF STRUCTURE EPIPHYSIS OF HUMERUS AND FEMUR OF
MEN**

R.V. Riabokon, N.V. Koshelev, T.E. Mahmudov

Scientific Supervisor: Prof., Dr. N.N. Medvedeva

Krasnoyarsk State Medical University n.a. of professor V.F. Voyno-Yasenetskiy, Russia, Krasnoyarsk,

Partizana Jeleznyaka str. 1, 660022

E-mail: r-ryabokon@mail.ru

Abstract. *In the present study, we present the results of a study of constitutional features of the internal structure of the humeral epiphysis and femoral bones of men. The material for the research were the bones of the corpse of men of the first period of mature age (21 - 35 years). To evaluate the internal structure of the bones were taken X-pictures of right shoulder and thigh bones of corpses of men without visible traumatic injuries of the musculoskeletal system, acute and chronic diseases of the skeleton. The internal structure of cancellous bone was evaluated by a three-point system, and was divided into small- cellularity, medium-cellularity and large-cellularity. For the epiphysis of andromorphs of the femur is more typical large-cellularity structure, uniform distribution in mesomorphs and the predominance of small- cellularity structure in ginekomorphs.*

Введение. Механические свойства кости, такие как прочность, зависит от макро- и микроскопического строения и состава костной ткани. Апрочный принцип строения перекладин губчатого вещества костей обеспечивает высокую способность противодействию их механическим нагрузкам [1]. Костные балки губчатого вещества костей расположены в определенных направлениях, по которым кость испытывает механическое напряжение. Под влиянием нагрузок кости подвергаются физиологической перестройке, тем самым приводя к структурным изменениям аппарата движения. Наибольшие структурные изменения в диафизах вызываются динамической нагрузкой на сгибание, а осевые механические воздействия в большей степени влияют на строение эпифизов [2]. Уровень двигательной активности, являясь результатом повседневной деятельности человека, носит индивидуальный характер, но, как правило, динамические нагрузки обусловлены работой и анатомо-физиологическими особенностями мышечной системы, что делает актуальным использование конституционального подхода в изучении костной ткани и кости в целом. Конституциональному подходу в работах современных исследователей по изучению морфологических особенностей организма уделяется большое внимание [3, 4]. Соматотип человека как морфологическое выражение конституции является своеобразным индикатором состояния организма в целом и его отдельных органов и систем [5].

Костная система является взаимосвязанной с деятельностью всего организма и позволяет наиболее достоверно отразить морфологический облик человека. На сегодняшний день изучение цитоархитектоники костной ткани носит исследовательский характер, но в будущем эти методы будут включены в клиническую практику, что приведет к персонализированному подходу в лечении заболеваний костной системы [6]. Цель исследования: изучить внутреннюю структуру эпифизов костей проксимальных сегментов конечностей мужчин в зависимости от их морфотипа.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования явились плечевые (98) и бедренные (98) кости от трупов мужчин первого периода зрелого возраста (21 – 35 лет). Определение типа телосложения осуществлялось по индексу полового диморфизма Дж. Таннера с учетом региональных особенностей анатомических характеристик мужчин [3,4, 7]. Для оценки внутренней структуры костей скелета были сделаны рентгеновские снимки костей без видимых травматических повреждений опорно-двигательного аппарата и признаков острой и хронической патологии скелета. При этом исследовалась ячеистость проксимального и дистального эпифизов плечевых и бедренных костей. Внутренняя структура губчатого вещества оценивалась по трехбалльной системе [8]. Для выявления функциональных особенностей в строении эпифизов костей использовали метод непараметрической статистики расчета критерия χ^2 Пирсона в программе StatSoft Statistica v 10.0.

Результаты. При анализе по индексу Д. Таннера (1968) мужчины распределились следующим образом: представители гинекоморфного морфотипа встречались в 21,5%, мезоморфного – в 51% и андроморфного – в 27,5% случаев. Соотношение составляет: 1,0:2,4:1,3. Для внутренней структуры проксимальных эпифизов плечевой кости мужчин характерна мелкая ячеистая структура, причем прослеживается тенденция к увеличению доли таковой в ряду андроморф – мезоморф – гинекоморф. Для дистальных эпифизов у представителей андроморфного типа телосложения характерна одинаковая частота встречаемости вариантов ячеистости с дальнейшим увеличением доли среднеячеистой структуры у мужчин мезоморфного и гинекоморфного морфотипов (табл. 1).

Таблица 1

Внутренняя структура проксимальных и дистальных эпифизов плечевой кости мужчин различных морфотипов по Дж. Таннеру

Морфотип	Отдел кости	Мелкоячеистая структура	Среднеячеистая структура	Крупноячеистая структура
Андроморфный	Проксимальный эпифиз	50%	29%	21%
	Дистальный эпифиз	25%	33%	42%
Мезоморфный	Проксимальный эпифиз	79%	17%	4%
	Дистальный эпифиз	33%	54%	13%
Гинекоморфный	Проксимальный эпифиз	92%	8%	0%
	Дистальный эпифиз	29%	71%	0%

Для внутренней структуры проксимальных эпифизов бедренных костей у мужчин андроморфного типа телосложения характерно крупноячеистое строение. У представителей мезоморфного и гинекоморфного морфотипов доля крупноячеистой структуры снижается за счет увеличения доли мелкоячеистого губчатого вещества. Для дистальных эпифизов бедренной кости представителей андроморфного

морфотипа также характерна крупноячеистая структура, у лиц мезоморфного типа распределение равномерное, а для гинекоморфов характерно преобладание средней ячеистости (табл. 2).

Таблица 2

Внутренняя структура проксимальных и дистальных эпифизов бедренной кости мужчин различных морфотипов по Дж. Таннеру

Морфотип	Отдел кости	Мелкоячеистая структура	Среднеячеистая структура	Крупноячеистая структура
Андроморфный	Проксимальный эпифиз	10%	37%	53%
	Дистальный эпифиз	5%	32%	63%
Мезоморфный	Проксимальный эпифиз	41%	18%	41%
	Дистальный эпифиз	30%	35%	35%
Гинекоморфный	Проксимальный эпифиз	50%	39%	11%
	Дистальный эпифиз	28%	50%	22%

При проверке статистических гипотез о влиянии функциональных особенностей кости на внутреннее строение губчатого вещества эпифизов кости методом расчета критерия χ^2 Пирсона получили значения 36,239 и 1,403 для плечевой и бедренной костей соответственно.

Закключение. Среди особенностей строения эпифизов плечевой кости у представителей всех морфотипов можно выделить преобладание мелкоячеистой структуры в проксимальных с последующим укрупнением до среднеячеистой и крупноячеистой в дистальных эпифизах. Это объясняется различной функциональной нагрузкой на проксимальный и дистальный эпифизы. Для эпифизов бедренной кости более характерна крупноячеистая структура у андроморфов, равномерное распределение у мезоморфов и преобладание мелкоячеистой структуры у гинекоморфов. Тенденция к укрупнению для эпифизов бедренной кости статистически не значима, что объясняется равномерным распределением нагрузки по протяжению бедренной кости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мазуров В.И. Болезни суставов. — СПб.: СпецЛит, 2008. — 408 с.
2. Oba M. Effect of femoral canal shape on mechanical stress distribution and adaptive bone remodelling around a cementless tapered-wedge stem // Bone Joint Res. – 2016 Sep;5(9). – 362-369.
3. Горбунов Н.С. Региональные анатомические стандарты тела мужчин // Сибирское медицинское обозрение. - 2007. - № 2 (43). - С. 79-85.
4. Медведева Н.Н. Длинные трубчатые кости населения города Красноярска // Сибирское медицинское обозрение. - 2004. - № 1 (30). - С. 51-54.
5. Чикун В.И. Идентификация типа телосложения мужчин по длинным трубчатым костям конечностей // Морфологические ведомости. – 2004. - № S1-2. - С. 117.
6. Griffith J.F. Looking beyond bone mineral density: Imaging assessment of bone quality // Ann N Y Acad Sci. – 2010 Mar;1192. – P. 45-56.
7. Таннер Дж. Рост и конституция человека: пер. с англ. // Биология человека. – М., 1968. – С. 247–326.
8. Алексеева Т.И. Морфофункциональная характеристика посткраниального скелета азиатских эскимосов // Палеоантропология Сибири. – М., 1980. – С. 131–153.

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 ПРИ
ФОРМИРОВАНИИ АДДИКТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ**

Д.Н. Савочкина, Е.Г. Полтавская

Научный руководитель: д.м.н. Е.И. Мастерова

НИИ психического здоровья Томского НИМЦ,

Россия, г. Томск, ул. Алеутская, 4, 634014

E-mail: kokodasha@yandex.ru

**PHENOTYPIC FEATURES OF INTERLEUKIN-6 GENE POLYMORPHISM IN THE CONTEXT OF
FORMATION OF ADDICTIVE PATHOLOGY**

D.N. Savochkina, E.G. Poltavskaya

Scientific Supervisor: MD E.I. Masterova

Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences

Russian Federation, Tomsk, Aleutskaya Street 4, 634014

E-mail: kokodasha@yandex.ru

Abstract. Search for biomarkers of addictive disorders including molecular-genetic and immunoregulatory characteristics is of relevance. 114 persons with mental and behavioural disorders caused by use of psychoactive substances and 97 conditionally healthy persons have been examined. The assessment of interleukin-6 gene polymorphism rs1800797 has been carried out with use of real-time PCR detection system. Level of extracellular mitogen-induced production of interleukin-6 has been measured on the Luminex 200 multiplex analyzer (USA). Intracellular contents of interleukin-6 have been estimated in mononuclears of stimulated LPS culture of whole blood on the FACS Calibur flow cytofluorimeter (BD, USA). Narcological patients are characterized by higher mitogen-induced production of interleukin-6. Persons with GG genotype of interleukin-6 gene polymorphism rs1800797 have demonstrated significant increase of production of interleukin-6. The GG genotype of interleukin-6 gene polymorphism rs1800797 makes the maximal contribution to formation of mental and behavioural disorders caused by use of psychoactive substances and can be a marker of addictive pathology.

Введение. В настоящее время установленным фактом является наличие генетически детерминированных механизмов биологической предрасположенности к употреблению психоактивных веществ и развитию синдрома зависимости [1]. Особого внимания заслуживают изменения цитокинового баланса при аддикциях, которые характеризуются разноплановыми сдвигами провоспалительных и противовоспалительных растворимых клеточных факторов в разные сроки и этапы зависимых расстройств [2, 3]. Возможно, что одним из патогенетических механизмов возникновения аддикции и предрасположенности к ее формированию является активация клеток иммунной системы, приводящая к комплексу реакций центральной нервной системы посредством взаимодействия цитокиновых и нейромедиаторных механизмов в мозге [4]. Ранее нам было показано, что интерлейкин-6 (IL-6) значимо вовлечен в формирование и течение аддиктивной патологии [5]. В связи с этим, актуальным является поиск

биомаркеров аддитивных расстройств, включающих молекулярно-генетические и иммунорегуляторные характеристики. Целью данного исследования было изучение ассоциации полиморфизма гена *IL-6* с его вне- и внутриклеточной продукцией и его роли в формировании аддитивной патологии.

Материалы и методы исследования. Обследование проведено у 211 испытуемых со средним возрастом $23,4 \pm 6,4$ лет. Обследованные были разделены на группы: лица с психическими и поведенческими расстройствами, вызванными употреблением психоактивных веществ (наркологические пациенты) ($N=114$) и условно здоровые лица (контрольная группа) ($N=97$). Клинические диагнозы пациентов классифицировались по МКБ-10 как *F11.1*, *F11.2*, *F19.1*, *F19.2*, *F12.1*, *F12.2*. Исследование внеклеточной митогенстимулированной продукции *IL-6* в супернатантах культуры клеток крови проводилось на мультиплексном анализаторе Luminex 200 (США) с использованием набора реагентов Human Cyto/Chemokine (Merck Millipore). Внутриклеточное содержание *IL-6* оценивали в мононуклеарах стимулированной LPS культуре цельной крови на проточном цитофлюориметре FACS Calibur (BD, США) с использованием набора реагентов BD Cytfix/Cytoperm Plus. Результаты выражали в относительном количестве (%) $CD14^+$ моноцитов, продуцирующих *IL-6*. Оценка полиморфизма *rs1800797* гена интерлейкина-6 проведена методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих *TaqMan*-зондов.

Результаты. Результаты исследования внеклеточной митогенстимулированной продукции *IL-6* приведены в Таблице 1. Наркологические пациенты характеризовались повышенной митогениндуцированной продукцией провоспалительного *IL-6* по сравнению с лицами контрольной группы. Исследование внутриклеточного содержания *IL-6* в мононуклеарах выявило снижение относительного содержания $CD14^+$ моноцитов с внутриклеточной продукцией *IL-6* у лиц с психическими и поведенческими расстройствами, вызванными употреблением психоактивных веществ по сравнению с лицами контрольной группы.

Таблица 1

Уровень митогениндуцированной вне- и внутриклеточной продукции *IL-6* мононуклеарными клетками обследованных лиц [Median (LQ, UQ)]

Показатели	Условно здоровые лица	Наркологические пациенты
<i>IL-6</i> , пкг/мл	2203,0 (888,2; 4568,0)	5445,9 (3234,7; 15381,6) *
Стимул. внутриклет. $CD14^+$ <i>IL-6</i> ⁺ , %	27 (17; 40)	20 (13; 36)

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

Следующим этапом исследования было изучение ассоциации полиморфизма *rs1800797* гена *IL-6* с формированием психических и поведенческих расстройств, вызванных употреблением психоактивных веществ. Для этого сравнивались группы с аддитивной патологией и условно здоровые лица. Результаты генотипирования *rs1800797* гена *IL-6* представлены в Таблице 2. Закон Харди-Вайнберга соблюдался для всех групп сравнения. Результаты частот распределения аллелей и генотипов *rs1800797* в нашем исследовании соответствуют данным проекта Нармар по распределению в европейских популяциях. Так,

для европейской популяции частоты аллелей *A* и *G* *rs1800797* составляют 0,60 и 0,40 соответственно, в то время как в нашем исследовании частоты аллелей *A* и *G* данного полиморфизма составили 0,629 и 0,371.

Таблица 2

Распределение частот генотипов и аллелей *rs1800797* гена *IL-6* в группах сравнения

<i>rs</i>	Генотипы Аллели	Группы сравнения		χ^2	<i>p</i>
		1 Условно здоровые лица	2 Наркологические пациенты		
<i>rs1800797</i>	<i>GG</i>	41 (42,3%)	38 (33,3%)	3,163	0,206
	<i>AG</i>	40 (41,2%)	61 (53,5%)		
	<i>AA</i>	16 (16,5%)	15 (13,2%)		
	<i>G</i>	122 (62,9%)	137 (60,1%)	0,350	0,560
	<i>A</i>	72 (37,1%)	91 (39,9%)		

У лиц с генотипом *GG* полиморфизма *rs1800797* гена *IL-6* обнаружено значимое возрастание продукции *IL-6* у лиц с аддитивной патологией по сравнению с условно здоровыми лицами (5068,18(3512,29;15078,10) и 1698,00 (692,09; 3872,36), $p=0,0058$). У обследованных с этим же генотипом с наркологическим диагнозом выявлена тенденция к возрастанию процента моноцитов, продуцирующих *IL-6* по сравнению с лицами контрольной группы (78,6% и 50,0%, $p=0,086$). По остальным генотипам ассоциаций с вне- и внутриклеточной продукцией *IL-6* обнаружено не было.

Заключение. Таким образом, проведенное исследование показало, что генотип *GG* полиморфизма *rs1800797* гена *IL-6* оказывает значимый вклад в формирование аддитивной патологии и может являться маркером психических и поведенческих расстройств, вызванных употреблением психоактивных веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анохина И.П. Генетика зависимости от психоактивных веществ // Наркология. Национальное руководство / И.П. Анохина, А.О. Кибитов, И.Ю. Шамакина. – М.: Гэотар-Медиа, 2008. – С. 52 – 84.
2. Панченко Л.Ф., Пирожков С.В., Наумова Т.А., Теребилина Н.Н., Баронец В.Ю., Федоров И.Г., Тотолян Г.Г. Изменение профиля воспалительных и противовоспалительных цитокинов при развитии алкогольной болезни печени // Наркология. – 2010. – Т. 9. – № 4. – С. 86 – 77.
3. Reece, A.S. (2012) Relative and age-dependent stimulation of soluble and cellular immunity in opiate dependence. J Addict Med, Vol. 6, no. 1, pp. 10–17.
4. Клименко В.М. Цитокины и нейробиология поведения больного // В кн.: Актуальные проблемы нейроэндокринологии / под ред. В. Г. Шаляпиной, П. Д. Шабанова. – СПб.: Элби-СПб, 2005. – С. 249 – 306.
5. Невидимова Т.И., Ветлугина Т.П., Батухтина Е.И., Савочкина Д.Н. Особенности продукции цитокинов при болезнях зависимости // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № – 1-1. – С. 49 – 51.

**АНЕУПОИДИЯ В ЦИТОТРОФОБЛАСТЕ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА С РАЗЛИЧНЫМ
ГЛОБАЛЬНЫМ УРОВНЕМ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОМА**

Р.Р. Савченко¹, С.А. Васильев²

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

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

²НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН

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

E-mail: savchenko_renata@mail.ru

**ANEUPLOIDY IN HUMAN EMBRYONIC CYTOTROPHOBLAST WITH DIFFERENT LEVEL OF
GLOBAL GENOME METHYLATION**

R.R. Savchenko¹, S.A. Vasilyev²

Scientific Supervisor: S.A. Vasilyev, PhD

¹National Research Tomsk State University,

²Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center

of Russian Academy of Science

Russia, Tomsk, 36 Lenin Ave., 634050

E-mail: savchenko_renata@mail.ru

Abstract. *In this study, we investigated the frequency of aneuploidy of chromosomes 8 and X in human embryonic tissues with different level of global genome methylation. A comparative analysis of the methylation index of LINE-1 retrotransposon, which is largely reflecting the methylation profile of the genome, is performed in cytotrophoblast cells of 24 spontaneous abortions with a normal karyotype, as well as in the control group of 17 induced abortions of the first trimester of pregnancy. It was shown that the cytotrophoblast of spontaneous abortions with normal karyotype and with hypomethylation of LINE-1 is characterized by increased frequency of aneuploidy of chromosome 8, however, the frequency of aneuploidy of X chromosome was not differed significantly between the explored groups of abortions. In addition, it should be noted, that the high frequency of aneuploidy in the cytotrophoblast cells of abortions was much higher than it was detected in other tissues of the human organism.*

Введение. Высокая частота репродуктивных потерь, характерная для ранних этапов онтогенеза человека, имеет многофакторную природу. Доминирующая роль в этиологии нарушений раннего эмбрионального развития отводится генетическим факторам, при этом около половины внутриутробно погибших зародышей имеют числовые аномалии хромосомного набора. Оставшаяся значительная часть спонтанных абортусов характеризуется нормальным кариотипом, и причины остановки их развития часто остаются неясными. За последние годы в литературе накапливаются сведения о значительной роли не только генетических, но и эпигенетических аномалий, несовместимых с нормальным протеканием эмбрионального развития, особое место среди которых занимает изменение профиля метилирования ДНК. Предположительно, снижение уровня глобального метилирования генома оказывает влияние на частоту возникновения числовых хромосомных aberrаций в следствие гипометилирования цитозина в

центромерных и прицентромерных участках хромосом [1], которое, в свою очередь, приводит к изменению конформации прицентромерного хроматина, нарушениям прикрепления микротрубочек веретена деления к хромосомам и, в конечном итоге, к неправильной сегрегации хромосом и анеуплоидии. Таким образом, цель настоящего исследования заключалась в оценке частоты возникновения числовых хромосомных нарушений в клетках цитотрофобласта эмбрионов человека с различным глобальным уровнем метилирования генома.

Материалы и методы исследования. Был проведен анализ частоты анеуплоидии по хромосомам 8 и X в клетках цитотрофобласта хориона 24 спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (46,XX – 16, 46,XY – 8 образцов) и 17 медицинских абортусов (46,XX – 8, 46,XY – 9 образцов). Оценка индекса метилирования LINE-1, являющегося маркером глобального уровня метилирования генома, осуществлялась с помощью пиросеквенирования по протоколу, описанному в [2]. Частота анеуплоидии оценивалась в клетках, выделенных из цитотрофобласта без этапа культивирования, с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) с ДНК-зондами, специфичными к центромерным участкам хромосом 8 и X по протоколу, описанному в [3]. Для сравнения групп использовался непараметрический тест Манна-Уитни. Корреляционный анализ производился с помощью рангового теста корреляции Спирмена.

Результаты. Частота анеуплоидии по хромосоме X, как и ожидалось, оказалась значительно выше у абортусов женского пола по сравнению с абортусами мужского пола в обеих исследованных группах. Различий по частоте анеуплоидии хромосомы 8 между абортусами обоих полов не выявлено ($p < 0,01$) (табл.1). В группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом наблюдалась повышенная частота анеуплоидии по хромосоме 8, а также повышенная суммарная частота анеуплоидии по хромосомам 8 и X по сравнению с группой медицинских абортусов ($p = 0,048$ и $p = 0,034$, соответственно) (табл. 1). Среди зародышей мужского пола была обнаружена повышенная частота хромосомы 8 и суммарная частота анеуплоидии по обоим хромосомам ($p = 0,04$ и $p = 0,024$, соответственно) по сравнению с медицинскими абортусами, в то время как частота анеуплоидии по хромосоме X не отличалась значимо между группами абортусов как отдельно в группах с мужским и женским кариотипом, так и в объединенной выборке, хотя она и была немного выше в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (табл. 1).

Индекс метилирования LINE-1 в группе спонтанных абортусов ($40,50 \pm 4,57 \%$) был статистически значимо ниже по сравнению с группой медицинских абортусов ($45,36 \pm 7,25 \%$) ($p = 0,05$) (табл. 1). При этом, помимо среднего уровня метилирования LINE-1, значимые отличия между группами наблюдались только по второму из проанализированных CpG-сайтов в промоторе LINE-1 ($37,23 \pm 6,10 \%$ и $46,38 \pm 8,30 \%$ в группах спонтанных и медицинских абортусов, соответственно, $p = 0,004$) (табл. 1).

Для среднего индекса метилирования LINE-1 в группе спонтанных абортусов была показана обратная корреляция с частотой анеуплоидии по хромосоме 8 ($R = -0,34$, $p = 0,12$) и суммарной частотой анеуплоидии по хромосомам X и 8 ($R = -0,36$, $p = 0,095$), однако статистически значимыми данные корреляции являлись лишь для второго из проанализированных CpG-сайтов в промоторе LINE-1 ($R = -0,53$, $p = 0,011$ и $R = -0,58$, $p = 0,005$, соответственно). Корреляции между индексом метилирования LINE-1 с частотой анеуплоидии по хромосоме X, а также с частотами анеуплоидии по обоим исследованным хромосомам в группе медицинских абортусов оказались статистически незначимыми.

Таблица 1

Частота анеуплоидии по хромосомам 8 и X и средний индекс метилирования LINE-1 в группах спонтанных абортусов с нормальным кариотипом и медицинских абортусов

		46,XY	46,XX	Объединенная выборка
СА НК	Частота анеуплоидии по хромосоме 8, %	2,87 ± 0,78; 1,90-4,30	2,66 ± 1,40; 1,00-5,69	2,73 ± 1,22; 1,00-5,69
	Частота анеуплоидии по хромосоме X, %	0,73 ± 0,54; 0,20-1,90	1,79 ± 1,02; 0,50-3,90	1,44 ± 1,01; 0,20-3,90
	Суммарная частота анеуплоидии по хромосомам 8 и X, %	3,60 ± 1,03; 2,10-5,20	4,45 ± 2,05; 2,00-8,27	4,17 ± 1,80; 2,00-8,27
	Средний индекс метилирования LINE-1, %	39,96 ± 4,42; 33,33-46,33	40,81 ± 4,80; 32,00-49,33	40,50 ± 4,58; 32,00-49,33
МА	Частота анеуплоидии по хромосоме 8, %	1,86 ± 0,87; 1,17-3,37	2,03 ± 0,85; 0,80-3,14	1,95 ± 0,84; 0,80-3,37
	Частота анеуплоидии по хромосоме X, %	0,39 ± 0,20; 0,00-0,60	1,61 ± 0,98; 0,47-3,50	1,03 ± 0,91; 0,00-3,50
	Суммарная частота анеуплоидии по хромосомам 8 и X, %	2,24 ± 0,97; 1,30-3,77	3,64 ± 1,18; 2,30-5,56	2,98 ± 1,27; 1,30-5,56
	Средний индекс метилирования LINE-1, %	45,67 ± 8,08; 38,00-57,67	45,00 ± 6,89; 34,33-54,00	45,36 ± 7,25; 34,33-57,67

Примечание: СА НК – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом; МА – медицинские абортусы; 46,XY – абортусы мужского пола; 46,XX – абортусы женского пола; данные представлены в виде среднего ± станд. отклонения; минимум-максимум.

Закключение. Таким образом, в цитотрофобласте спонтанных абортусов с нормальным кариотипом и гипометилированием LINE-1 было обнаружено повышение частоты анеуплоидии по хромосоме 8 в условиях *in vivo*. Возможно, что высокая частота нарушений сегрегации хромосом в клетках спонтанных абортусов с нормальным кариотипом отражает повышенный уровень хромосомной нестабильности на фоне гипометилирования генома. В целом, необходимо отметить высокую частоту анеуплоидии в клетках цитотрофобласта, значительно превышающую выявляемую в других тканях организма.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 14-04-01003 и стипендии Президента РФ № СП-3647.2015.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schueler, M. G., Sullivan B. A. (2006). Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, no 7. pp. 301 – 313.
- Васильев С. А., Толмачева Е. Н., Кашеварова А. А., Саженова Е. А., Лебедев И. Н. Статус метилирования ретротранспозона LINE-1 при хромосомном мозаицизме на ранних стадиях эмбрионального развития человека // Молекулярная биология. – 2015. – №1. – С. 165 – 174.
- Васильев С. А., Тимошевский В. А., Лебедев И. Н. Цитогенетические механизмы генерации анеуплоидии в соматических клетках профессионалов ядерно-химического производства с инкорпорированным плутонием 239. // Генетика. – 2010. – Т. 46. – № 11. – С. 1565 – 1570.

**МОНИТОРИНГ СОСТОЯНИЯ ФУНКЦИИ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ У ДЕТЕЙ С
ОБОСТРЕНИЕМ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ**

О.Е. Семерник, А.О. Андреева, И.В. Семерник

Научный руководитель: профессор, д.м.н. А.А. Лебеденко

Ростовский государственный медицинский университет,

Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский 29, 344022

E-mail: semernick@mail.ru

MONITORING RESPIRATORY FUNCTION IN CHILDREN WITH ASTHMA EXACERBATION

O.E. Semernik, A.O. Andreeva, I.V. Semernik

Scientific Supervisor: Prof., MD A.A. Lebedenko

Rostov State Medical University,

Russia, Rostov-on-Don, Lane Nakhichevan 29, 344022

E-mail: semernick@mail.ru

Abstract. *The aim of the research was to study the changes in rates of respiratory function in children with asthma exacerbation. The study involved 63 children aged 6 to 18 years with asthma of varying severity in the period of exacerbation. All children underwent complex clinical and instrumental examination including spirometry and body plethysmography. Results of the study of respiratory function in children with asthma have shown that a change in speed and capacity indicators at most patients. And the most pronounced changes have been reported in patients who are not receiving adequate anti-inflammatory therapy. A comprehensive study of changes in the bronchopulmonary system in children during exacerbation of asthma have made it possible not only to diagnose the disease, but also to spend time correcting the prescribed therapy.*

Введение. В настоящее время число больных бронхиальной астмой (БА) увеличилось во всем мире и достигло 300 млн. человек [1]. Своевременная диагностика данного заболевания является весьма актуальной проблемой, так как эффективность проводимого лечения на поздних стадиях заболевания при появлении выраженных симптомов болезни существенно снижается. Поэтому в настоящее время существует целый ряд инструментальных методов обследования, позволяющих выявить нарушения в работе бронхолегочной системы, а комплексное обследование детей в периоде обострения заболевания дает возможность вовремя диагностировать заболевание и предотвратить развитие осложнений в будущем [2, 3, 4].

Цель исследования: изучить изменение показателей функции внешнего дыхания у детей с обострением бронхиальной астмы.

Материалы и методы исследования. Для реализации поставленной цели были обследованы 63 ребенка с установленным диагнозом БА. Диагноз был верифицирован в соответствии с рекомендациями Национальной программы «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» (2014). Пациенты обследованы в периоде обострения заболевания. Всем больным проведено комплексное клинико-лабораторное обследование. Спирографическое исследование проводилось на компьютерном спирометре Minispir Light, MIR (Италия), а бодиплетизмография - на бодиплетизмографе POWERCUBE

BODY (*GANSHORN*) с ультразвуковым датчиком потока. Процедура обследования соответствовала стандартам локально-этического комитета Ростовского государственного университета.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью набора прикладных программ «Microsoft Office 2000 Pro» for Windows, для статистического анализа применялась компьютерная программа «STATISTICA 6.0». Анализ включал в себя определение средних арифметических величин, коэффициентов корреляции. Достоверность различий между группами по среднеарифметическим величинам, а также достоверность коэффициента корреляции определялась по критерию Стьюдента – t . Достоверным считался результат при $t > 2$, при котором $p < 0,05$. [4].

Результаты. У подавляющего числа обследованных больных отмечалось легкое течение БА (91,55%) и лишь у 12 человек (8,45%) среднетяжелое. При этом средний возраст манифестации заболевания составил $5,47 \pm 0,40$ лет.

По данным спирографического исследования у большинства детей в периоде обострения заболевания зарегистрировано снижение жизненной емкости легких (ЖЕЛ), средние значения составили $83,06 \pm 9,38\%$. При этом также отмечено снижение значений объема форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ1) – $73,23 \pm 5,48\%$. Это может свидетельствовать о снижении функциональных возможностей бронхолегочной системы ребенка в периоде обострения заболевания, вызванной бронхиальной обструкцией. Также у детей с БА отмечено снижение скоростных показателей, при этом наиболее значимое изменение максимальной объемной скорости потока (МОС) отмечается в точке 25% и 50% (МОС 25% – $75,00 \pm 5,77\%$, МОС 50% – $76,33 \pm 7,38\%$, МОС 75% – $89,00 \pm 7,92\%$), что указывает на обструкцию в крупных и средних бронхах (до 10 генерации).

Подавляющее большинство обследованных пациентов получали базисную терапию (75,35%) и лишь четверть больных (24,65%) не использовали противовоспалительные препараты. Средняя продолжительность терапии составила – $2,75 \pm 0,39$ лет. При этом установлена достоверная обратная корреляционная зависимость между продолжительностью использования препаратов базисной терапии и изменением скоростных показателей ($r = -0,78$), т.е. чем меньше времени пациент принимал препараты, тем меньше значения максимальной объемной скорости потока у него были зарегистрированы по результатам спирометрического исследования.

По результатам проведенного бодиплетизмографического исследования зарегистрировано повышение бронхиального сопротивления (БС) у большинства обследованных детей и средние его значения составили $108,05 \pm 8,51\%$. При этом умеренное повышение значений БС отмечалось у 38,09%, значительное – у 14,29% и резкое у 9 (14,29%) пациентов. Важно отметить, что у 11,11% пациентов, имеющих нормальные показатели по результатам спирографического исследования также установлено повышение значений БС более $0,30$ кПа*с/л.

Общая емкость легких соответствовала нормальным показателям у 80,95% обследованных пациентов и составила $93,67 \pm 3,39\%$. Средние значения остаточного объема легких превышали границы нормы ($196,43 \pm 15,46\%$), причем у большинства больных отмечались значительные изменения данного параметра (75,0%). У 57 (90,48%) пациентов отмечалось повышение отношения ООЛ к ОЕЛ выше нормальных значений. Важно отметить, что у пациентов, не получающих базисную терапию показатели отношения ООЛ/ОЕЛ ($213,89 \pm 11,78\%$) достоверно значимо превышали значения больных, использующих противовоспалительные препараты ($163,08 \pm 15,85$) [$p = 0,026$]. Эти изменения указывают

на снижение эластических свойств легких и могут являться начальными проявлениями эмфизематозного изменения легочных тканей.

Заключение. Результаты проведенного исследования функции внешнего дыхания у детей с БА показали, что у большинства обследованных пациентов отмечается не только изменение скоростных, но и емкостных показателей. Причем наиболее выраженные изменения отмечаются у пациентов, не получающих адекватную противовоспалительную терапию. Также установлено, что совместное применение двух методов обследования бронхолегочной системы, таких как спирография и бодиплетизмография, позволяет получить более точную информацию о состоянии пациентов. А комплексное изучение изменений, происходящих в бронхолегочной системе у детей в периоде обострения БА, дает возможность не только диагностировать данное заболевание, но и вовремя провести коррекцию назначенной терапии.

Статья подготовлена по итогам исследования, проведенного в рамках научного проекта при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований № 16-38-00263 мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» 3-е изд., испр. и доп. – М.: Изд. дом «Атмосфера», 2014. – 108 с.
2. Адушкина А.Б., Олехнович В.М. Изменение функции внешнего дыхания у детей с бронхиальной астмой // Электронный научно-образовательный вестник "Здоровье и образование в XXI веке". - 2006. - Т. 8. - №1. - С. 20-21.
3. Семерник О.Е., Лебеденко А.А., Семерник И.В. и др. Радиочастотное сканирование грудной клетки как метод диагностики бронхиальной астмы детей // Известия высших учебных заведений. Физика. - 2015. - Т. 58. - № 8-2. - С. 328-330.
4. Семерник О.Е., Демьяненко А.В., Семерник И.В., Лебеденко А.А. Проектирование прибора для диагностики бронхиальной астмы у детей раннего возраста // Актуальные проблемы и достижения в медицине. Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. – Самара, 2015. - С. 136-138.

МЕТИЛИРОВАНИЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНА LINE-1 ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

В.В. Серебрякова

Научный руководитель: к.м.н. А.В. Марков

НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ,

Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10, 634050

E-mail: valerie2605@mail.ru

METHYLATION OF RETROTRANSPOSON LINE-1 IN ATHEROSCLEROSIS

V.V. Serebryakova

Scientific Supervisor: A.V. Markov

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center,

Russia, Tomsk, Nab. Ushaiki, 10, 634050

E-mail: valerie2605@mail.ru

Abstract. DNA methylation is one of the perspective but insufficiently studied epigenetic mechanisms which can be involved in atherosclerosis and related cardiovascular disease. Global DNA methylation estimated by the methylation level of retrotransposon LINE-1 in peripheral blood leukocytes (PBLs) was shown to be decreased in coronary heart disease and stroke. The aim of our study was to characterize LINE-1 methylation variability in PBLs of healthy persons (males, $n=36$), and, PBLs and cells of affected carotid arteries (CACs) of patients with atherosclerosis (males, $n=63$). LINE-1 methylation analysis was performed using bisulfite pyrosequencing. We showed significant hypomethylation ($p<0,05$) in both PBLs and CACs of patients in comparison with PBLs of healthy individuals. But there was no significant difference between LINE-1 methylation levels in matched PBLs and CACs of the same patients. Methylation level of LINE-1 in CACs but not in PBLs of patients with atherosclerosis was negatively associated with atherogenic index, which was partly in contrast with recent findings. Mild decrease in LINE-1 methylation with age was observed in PBLs of only healthy men. Absence of the same association in patients with atherosclerosis can be explained by stronger relation between LINE-1 methylation with the severity of the disease rather than age.

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются одной из главных причин смертности и инвалидизации населения в мире. Эпигенетическая вариабельность – перспективный, но недостаточно изученный механизм в комплексном процессе развития сердечно-сосудистой патологии [1]. Один из эпигенетических механизмов – метилирование ДНК – чаще всего представлен ковалентной модификацией цитозина, путем присоединения метильной группы в CpG-сайтах. Общий уровень метилирования ДНК обычно оценивают с помощью ретротранспозона LINE-1, он широко представлен в геноме человека и в норме гиперметилован в разных тканях. Гипометилирование LINE-1 в лейкоцитах крови наблюдается при ишемической болезни сердца и инсульте [2, 4], однако не ясно, как данное явление соотносится с изменениями, наблюдаемыми в пораженных атеросклерозом артериях.

Целью данной работы являлась характеристика вариабельности метилирования ретротранспозона LINE-1 в лейкоцитах и клетках сонных артерий при атеросклерозе у человека.

Материалы и методы. В исследовании использовались образцы ДНК, полученные из лейкоцитов крови и атеросклеротических бляшек сонных артерий мужчин с атеросклерозом ($n=63$), а также лейкоцитов крови здоровых мужчин ($n=36$). ДНК выделяли стандартным фенол-хлороформным микрометодом. Бисульфитная модификация ДНК была проведена с помощью набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research). Анализ уровня метилирования (процента метилированных цитозинов по каждой CpG-позиции) производился на приборе PyroMark Q24 (Qiagen). Обработка результатов проведена в программе SPSS Statistics 17.0 (IBM) с использованием непараметрических методов статистики: медиана, 1 и 3 квартили ($M (Q_1 - Q_3)$) для описания данных, критериев Манна-Уитни и Вилкоксона для сравнительного анализа и коэффициента корреляции Спирмена (ρ).

Результаты. Уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 оценивался по трем CpG-сайтам методом бисульфитного пиросеквенирования, описанным ранее [3]. По результатам анализа был вычислен усредненный уровень метилирования по анализируемому региону ДНК. Между уровнями метилирования трех CpG-сайтов и усредненным по региону значением во всех анализируемых тканях наблюдалась сильная положительная корреляция ($p < 0,05$), поэтому усредненный уровень был использован как основной показатель метилирования LINE-1.

Уровень метилирования LINE-1 в лейкоцитах здоровых мужчин составил 74,6% (69,8% - 76,7%). В клетках сонных артерий и лейкоцитах крови больных атеросклерозом наблюдалось статистически значимое гипометилирование LINE-1 по сравнению с образцами крови здоровых лиц (рис. 1). Вместе с тем, уровень метилирования в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий составил 68,9% (64,2% - 71,1%) и был ниже такового в лейкоцитах крови тех же пациентов (71,8% (62,4% - 73,6%)), но различия между данными показателями были не значимы. Более того, между ними наблюдалась положительная корреляция ($\rho = 0,29$; $p < 0,05$).

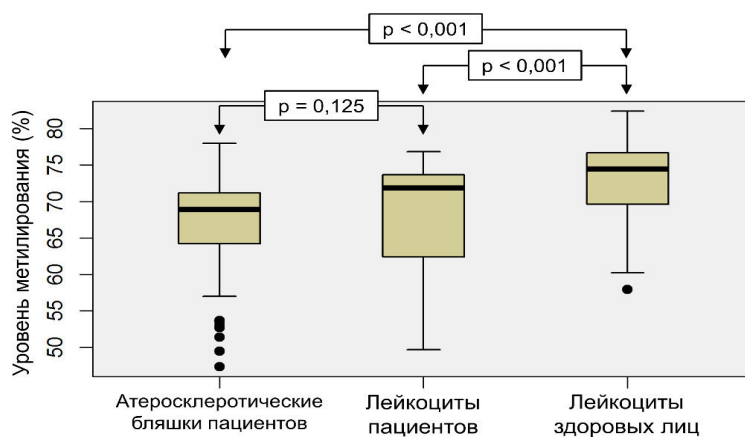


Рис. 1. Усредненный уровень метилирования по трем CpG-сайтам LINE-1 у больных и здоровых индивидов

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, которые также показали гипометилирование ретротранспозона LINE-1 при атеросклерозе и связали с риском развития его осложнений, причем значимая ассоциация была показана только для мужчин [2, 4, 5].

Поиск ассоциаций метилирования LINE-1 с клинико-лабораторными показателями пациентов с атеросклерозом выявил отрицательную корреляцию между индексом атерогенности и уровнем

метилования LINE-1 в атеросклеротических бляшках ($\rho = -0,35$; $p < 0,05$). Связь между метилированием LINE-1 в клетках крови и липидным профилем, включая индекс атерогенности, была показана другими исследователями [6, 7], однако по результатам настоящей работы не выявлена.

В выборке здоровых лиц наблюдалась слабая отрицательная корреляция общего уровня метилирования LINE-1 в лейкоцитах с возрастом ($\rho = -0,46$; $p < 0,05$), хотя для больных такая зависимость не показана. Связь гипометилирования LINE-1 с возрастом была найдена ранее в работе Bollati V. с соавторами [8]. Отсутствие зависимости от возраста в группе больных можно объяснить более сильной зависимостью уровня метилирования от тяжести заболевания, чем от возраста.

Заключение. Таким образом, в исследовании показано гипометилирование ретротранспозона LINE-1 у пациентов с атеросклерозом как в клетках пораженных сонных артерий, так и лейкоцитах периферической крови в сравнении с лейкоцитами здоровых индивидов. Обнаружена связь уровня метилирования LINE-1 с возрастом в группе здоровых индивидов, а также уровня метилирования в атеросклеротических бляшках сонных артерий больных с индексом атерогенности.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-01481А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhong, J., Agha, G., Baccarelli, A. A. (2016). The Role of DNA Methylation in Cardiovascular Risk and Disease. *Circulation research*, V. 118, no. 1, pp. 119-131.
2. Baccarelli, A., Wright, R., Bollati, V., Litonjua, A., Zanobetti, A., Tarantini, L. (2010). Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiology*, V. 21, no. 6, pp. 819.
3. Aoki, Y., Nojima, M., Suzuki, H., Yasui, H., Maruyama, R., Yamamoto, E. (2012). Genomic vulnerability to LINE-1 hypomethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma. *Genome medicine*, V. 4, no. 12, pp. 101.
4. Lin, R. T., Hsi, E., Lin, H. F., Liao, Y. C., Wang, Y. S., H Juo, (2014). LINE-1 methylation is associated with an increased risk of ischemic stroke in men. *Current neurovascular research*, V. 11, no. 1, pp. 4-9.
5. Guarrera, S., Fiorito, G., Onland-Moret, N. C., Russo, A., Agnoli, C., Allione, A. (2015). Gene-specific DNA methylation profiles and LINE-1 hypomethylation are associated with myocardial infarction risk. *Clinical epigenetics*, V. 7, no. 1, pp. 133.
6. Cash, H. L., McGarvey, S. T., Houseman, E. A., Marsit, C. J., Hawley, N. L., Lambert-Messerlian. (2011). Cardiovascular disease risk factors and DNA methylation at the LINE-1 repeat region in peripheral blood from Samoan Islanders. *Epigenetics*, V. 6, no. 10, pp. 1257-1264.
7. Pearce, M. S., McConnell, J. C., Potter, C., Barrett, L. M., Parker, L., Mathers, J. C., Relton, C. L. (2012). Global LINE-1 DNA methylation is associated with blood glycaemic and lipid profiles. *International journal of epidemiology*, V. 41, no. 1, pp. 210-217.
8. Bollati, V., Schwartz, J., Wright, R., Litonjua, A., Tarantini, L., Suh, H. (2009). Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mechanisms of ageing and development*, V. 130, no. 4, pp. 234-239.

**СОЗДАНИЕ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ОСНОВЕ 10-ГО ДОМЕНА
ФИБРОНЕКТИНА III ТИПА**

Я.Г. Сизенцова

Научный руководитель: к.б.н., С.В. Кулемзин

Новосибирский Государственный Университет, Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090

E-mail: sizentsova.yana@mcb.nsc.ru

**DEVELOPMENT OF CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS BASED ON THE 10TH FIBRONECTIN
TYPE III DOMAIN**

Y.G. Sizentsova

Scientific Supervisor: S.V. Kulemzin, Ph.D.

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

E-mail: sizentsova.yana@mcb.nsc.ru

Abstract. *Most of the CARs employ single-chain fragment of antibodies (scFv) as a target recognition module. ScFv, however, has some weak points, namely two-domain format and almost 30kDa weight. Here we describe CAR with the 10th human fibronectin type III domain as alternative antigen recognition module of CAR. We designed and developed mono- and bispecific Fn3CARs as a recognition module and proved their functionality.*

Введение. Одним из новых подходов к лечению злокачественных новообразований является клеточная иммунотерапия, основанная на адоптивном переносе модифицированных иммунных клеток, обеспечивающих выраженный противоопухолевый эффект. Значительные успехи были достигнуты при терапии CAR Т-лимфоцитами. CAR (Chimeric antigen receptor – химерный антигенный рецептор) – искусственно созданный рецептор, состоящий из внутриклеточной сигнальной части, трансмембранного участка и антигенраспознающего домена. В качестве антигенраспознающего домена обычно используют фрагмент антител в формате scFv (single chain variable fragment). ScFv представляет собой единую полипептидную цепь, в которой вариабельные домены легкой и тяжелой цепи иммуноглобулинов соединены линкером. В общем виде терапия CAR Т-лимфоцитами проводится следующим образом: в Т-клетки, выделенные из крови пациента, вводят генетические кассеты, кодирующие CAR необходимой специфичности, затем CAR Т-лимфоциты размножают и вводят обратно пациенту. Модифицированные таким образом Т-клетки приобретают способность распознавать опухолевые антигены при помощи антигенраспознающего модуля CAR, а внутриклеточный сигнальный участок CAR запускает активацию Т-лимфоцитов, что приводит к уничтожению раковых клеток. Эффективность CAR Т-клеточной терапии подтверждается рядом клинических испытаний, особенно при терапии гемобластозов [1,2]. Однако она может сильно снижаться при появлении и селективном размножении раковых клеток, на которых отсутствует или снижена экспрессия целевого антигена. Одной из стратегий, позволяющих решить проблему опухолевого ускользания, является создание CAR с двойной специфичностью. Получение таких CAR на основе scFv осложняется большим размером и низкой стабильностью последних в составе полидоменных белков. В настоящее время активно идет поиск новых белковых молекул, которые могут использоваться в качестве альтернативного антигенраспознающего модуля в составе CAR. Мы

предлагаем использовать для этой цели 10-ый домен фибронектина III типа (Fn3) человека. Fn3 имеет Ig-подобную структуру вариабельных доменов: антипараллельные β -складки с тремя петлями, которые аналогичны антигенраспознающим петлям иммуноглобулинов [3]. В эти петли можно вносить мутации, что делает возможным создание искусственных Fn3 со специфичностями к различным антигенам. Значительным преимуществом Fn3 является его небольшой размер (~10кДа) и высокая стабильность. Учитывая, что в природных белках Fn3-домены независимы друг от друга и образуют стабильные мультидоменные структуры, мы предположили, что на основе нескольких модулей Fn3 можно создавать полиспецифические CAR.

Материалы и методы исследования. Ранее в лаборатории иммуногенетики было разработано одиннадцать лентивирусных конструкций, три из которых кодируют Fn3-CAR, специфичные к VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2 – рецептор-2 васкулярного эндотелиального фактора роста), IGF-1R (Insulin-like growth factor 1 receptor – рецептор-1 инсулиноподобного фактора роста) или CEA (Carcinoembryonic antigen – карциноэмбриональный антиген), а другие восемь – биFn3-CAR к этим же мишеням. При помощи кальций-фосфатной трансфекции были получены лентивирусные частицы, которыми затем были трансдуцированы клетки Т-лимфомы Jurkat. Для активационного анализа инкубацию Fn3-CAR Jurkat с клетками-мишенями, экспонирующими VEGFR2, IGF-1R или CEA, проводили в соотношении 1:1. Процент CD69-положительных Fn3-CAR Jurkat Т-клеток детектировали с помощью метода проточной цитометрии.

Результаты. На первом этапе работы были получены три Т-клеточные линии Jurkat, стабильно экспрессирующие моноспецифические Fn3-CAR против VEGFR2, IGF-1R или CEA. Следует отметить, что клетки Jurkat не обладают цитотоксической активностью, поэтому функциональность CAR в контексте этих клеток определяют по способности CAR индуцировать специфическую активацию. Для проверки работоспособности каждого моноFn3-модуля, полученные CAR Т-клеточные линии были проинкубированы с клетками, несущими на своей поверхности соответствующую мишень (VEGFR2, IGF-1R или CEA). В качестве мишеней мы использовали HEK-293 Т (IGF-1R+), HEK-293 Т, транзитно экспрессирующую CEA, и HEK-293 Т 166, эктопически экспрессирующую VEGFR2. FACS анализ показал, что уже через 4 часа после начала инкубации с мишенями все CAR запускали бурную активацию клеток Jurkat, что проявлялось в экспрессии маркера ранней активации CD69. Таким образом, Fn3-домены могут служить распознающими модулями в составе CAR. На втором этапе работы мы получили восемь линий Jurkat, конститутивно экспрессирующих биFn3-CAR, специфические к VEGFR2, IGF-1R и CEA в разных вариантах. Для того, чтобы проверить работоспособность индивидуальных Fn3-доменов в составе биFn3-CAR, мы провели инкубацию полученных Fn3-CAR Jurkat с соответствующими мишенями. Через 4 часа после взаимодействия с клетками-мишенями биFn3-CAR Jurkat клетки успешно активировались (Рис. 1). Было установлено, что каждый Fn3-домен в составе CAR активировался независимо от другого Fn3-домена, из чего можно сделать вывод о работоспособности каждого Fn3-домена в CAR.

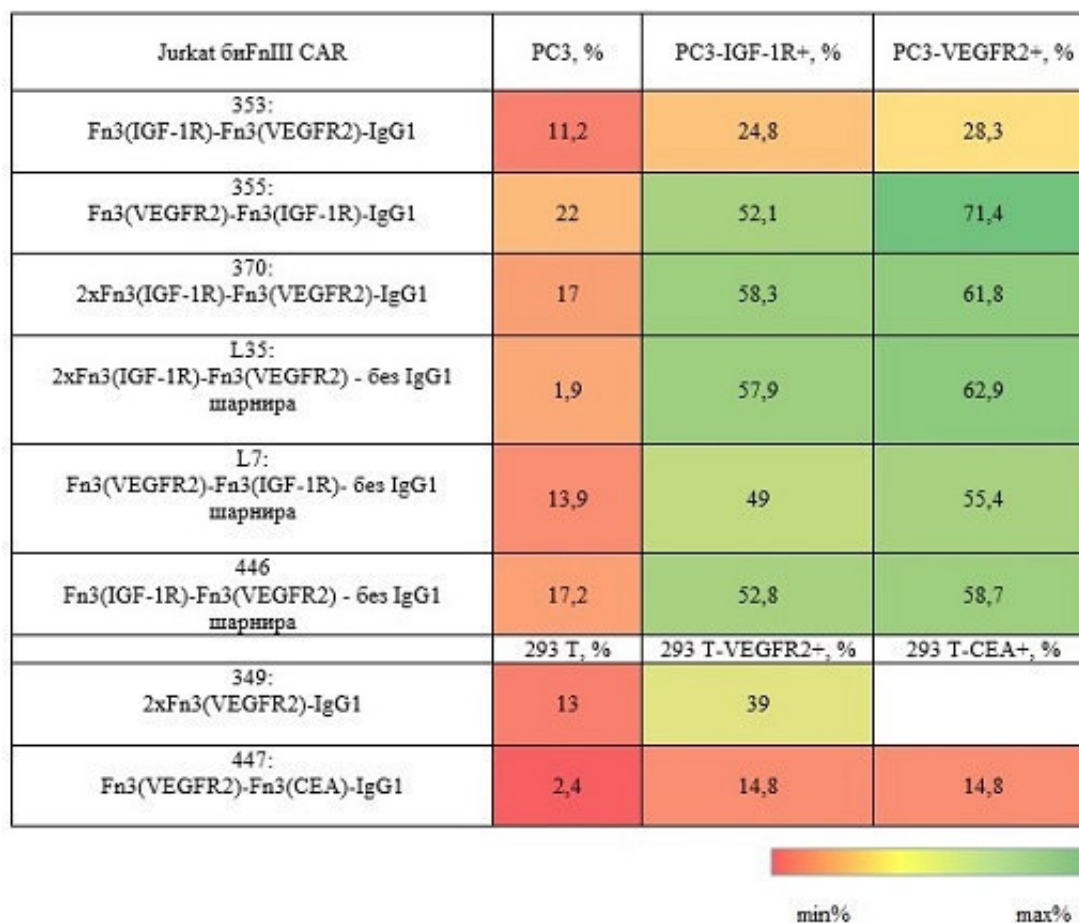


Рис. 1. Активирующие свойства биFn3-CAR против VEGFR2, IGF-1R и CEA. Указаны проценты CD69+ Fn3 CAR-Jurkat клеток

Закключение. Таким образом, нами впервые была показана способность Fn3 выступать в роли антигенраспознающего модуля в составе химерного антигенного рецептора и возможность создания биспецифических химерных антигенных рецепторов на основе Fn3 доменов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brentjens, R. J., Rivière, I., Park, J. H., Davila, M. L., Wang, X., Stefanski, J. et al (2011). Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. Blood, vol. 118, no.18, pp. 4817-4828.
2. Till, B. G., Jensen, M. C., Wang, J., Qian, X., Gopal, A. K., Maloney, D. G. et al. (2012). CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB. Blood, vol. 119, no.17, pp. 3940-3950.
3. Koide, S., Koide, A. & D. Lipovšek (2012). Target-binding proteins based on the 10th human fibronectin type III domain (¹⁰Fn3). Methods Enzymol, vol. 503, pp. 135-156.

ИЗУЧЕНИЕ АДАПТАЦИИ И ВИРУЛЕНТНОСТИ ВИРУСА ГРИППА A(H1N1)PDM09

Е.И. Соловьева

Научный руководитель: к.б.н. Е.А. Прокопьева.

Новосибирский государственный университет,

Россия, г.Новосибирск, ул. Пирогова, 2. 630090

E-mail: klena01@gmail.com

STUDY OF ADAPTATION AND VIRULENCE OF INFLUENZA VIRUS A(H1N1)PDM09

E.I. Solovyova

Principal Investigator: P.h.D. E.A. Prokopyeva

Novosibirsk State University

Russia, Novosibirsk, Pirogov st., 2. 630090

E-mail: klena01@gmail.com

Abstract. Today, acute respiratory infection (ARI) and influenza occupy the first place among the infectious diseases transmitted by airborne droplets. Influenza viruses are well adapted to animals and humans, affecting 5 to 30% of the world population, which leads to the death of people and animals, causing enormous economic damage. Influenza A(H1N1)pdm09 virus caused a pandemic in 2009. It is still largely unknown the molecular mechanism by which A(H1N1)pdm09 viruses were able to adapt to animals and then to humans. To address this problem, we obtained three adapted variants of pandemic A(H1N1)pdm09 virus by serial lung-to-lung passages in different genotypes of mice. The cross-infection of A(H1N1)pdm09 viruses helps to evaluate the virulence of pathogens. We obtained three adapted variants of the influenza A(H1N1)pdm09 virus. The most high virulence possess the strain A/Tomsk/273-MA1/2010(H1N1pdm09) which were adapted to BALB/c mice.

Введение. В 2009 году возникла первая пандемия XXI в., которую вызвал субтип вируса гриппа A(H1N1)pdm09, в результате погибло более полумиллиона людей и это составило менее 1% от всех заболевших [1]. На сегодняшний день вирус гриппа (ВГ) циркулирует среди сезонных вирусов гриппа, инфицируя людей. Подобная циркуляция может приводить к адаптации ВГ к человеческой популяции, что способствует усилению его вирулентных свойств и вероятному возникновению новых масштабных пандемий [2, 3].

Наиболее удобной моделью для изучения гриппозной инфекции являются мыши [4], в организме которых вирус легко адаптируется и становится летальным [5, 6]. В связи с этим целью работы стало: получить адаптированные варианты вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на мышах линий BALB/c, C57Bl/6z и аутбредных мышей CD1, а затем провести перекрёстное экспериментальное инфицирование мышей и сравнить вирулентные свойства адаптированных вариантов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09.

Материалы и методы. Для проведения эксперимента использовались две линии мышей BALB/c и C57Bl/6z, и аутбредные мыши CD1; и неадаптированный штамм ВГ A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09).

В лабораторных условиях была проведена последовательная адаптация пандемического вируса гриппа к мышам трёх различных групп, две из которых были представлены линейными инбредными мышами (BALB/c, C57Bl/6z) и одна - аутбредными мышами CD1.

Адаптация была выполнена путем проведения последовательных пассажей через легкие мышей 6-8-ми недельного возраста. Мышей интраназально инфицировали по 50 мкл раствора, содержащего

10^3 TCID₅₀/ml штамма A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09). После каждого пассажа отбирались животные с наиболее выраженными признаками болезни и из их легких выделяли вирус. После получения 100% летальности в исследуемых группах были получены адаптированные варианты пандемического ВГ A(H1N1)pdm09 и определены значения ЛД₅₀. Все работы с животными проводили в соответствии с протоколом исследования, утвержденным Биоэтическим Комитетом «Вектор».

Результаты. В результате адаптации были получены три штамма:

A/Tomsk/273-MA1/2010(H1N1pdm09) (**MA1**), адаптированный на мышах линии BALB/c;
A/Tomsk/273-MA2/2010(H1N1pdm09) (**MA2**), адаптированный на мышах линии C57BL/6z;
A/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09) (**MA3**), адаптированный на мышах CD1.

Используя полученные адаптированные варианты ВГ A(H1N1)pdm09, было проведено перекрестное интраназальное инфицирование мышей в дозе 5 МЛД₅₀. Мышей линии BALB/c разделили на две группы (n=10). Первую группу инфицировали штаммом MA2; вторую - штаммом MA3; мышей линии C57BL/6z (n=10), инфицировали ВГ MA1 и MA3; аутбредных мышей CD1 (n=10) инфицировали ВГ MA1 и MA2.

Таблица 1

Результаты летальности в эксперименте перекрестного инфицирования.

	Штамм MA1	Штамм MA2	Штамм MA3
Мыши линии BALB/c	100%	0%	80%
Мыши линии C57BL/6z	100%	100%	50%
Аутбредные мыши CD1	70%	10%	100%

Выводы. Получены три адаптированных варианта пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на мышах трех генотипов.

Пандемический вирус гриппа A(H1N1)pdm09 способен быстро адаптироваться к мышам различного генотипа вызывая 100% летальность.

Было выявлено, что штамм MA1, адаптированный на мышах линии BALB/c, обладает наибольшими вирулентными свойствами по сравнению с MA2 и MA3.

Полученные результаты подтверждают, что пандемичный вирус гриппа A(H1N1)pdm09 легко адаптируется к мышам, которые в природных условиях не заболевают гриппом [7], кроме того, вирус гриппа становится высоковирулентным не только для животных, на которых прошла адаптация, но и для других генетических групп мышей. Степень летальности гриппозного заболевания зависит от генотипа животных, а так же от вирулентных свойств адаптированного варианта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.who.int/en/>.
2. Литвинова О. М. и др. Этиология современного гриппа // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2001. – Т. 1. – С. 5-9.
3. Львов Д. К. Экология вирусов. В кн.: Медицинская вирусология. Рук-во. Ред.: академик РАМН Д. К. Львов. М.: МИА, 2008. С. 101–118.

4. Xu, L. (2011). Adaption of seasonal H1N1 influenza virus in mice / L. Xu, L. Bao, F. Li et al. // PLoS One. - № 6(12):e28901. doi: 10.1371/journal.pone.0028901.
5. Львов Д. К., Забережный А. Д., Алипер Т. И. Вирусы гриппа: события и прогнозы // Природа. – 2006. – Т. 6. – С. 3-13.
6. Lu X., Tumpey T.M., Morken T., Zaki S.R., Cox N.J., Katz J.M. (1999). A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans // Journal of virology. – V. 73. – N. 7. – P. 5903-5911.
7. Ilyushina, N.A. (2010). Adaptation of pandemic H1N1 influenza viruses in mice / N.A. Ilyushina, A.M. Khalenkov, J.P. Seiler et al. // Journal of virology - № 84(17). – P. 8607-16. doi: 10.1128/JVI.00159-10.

**РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *COMT* В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ
ПАРКИНСОНА И ЛЕВОДОПА-ИНДУЦИРОВАННЫХ ДИСКИНЕЗИЙ**

В.В. Тигунцев, И.А. Жукова

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

Неврологическая клиника Сибирского Государственного Медицинского Университета,

НИИ психического здоровья Томского НИМЦ

Россия, г. Томск, ул. Алеутская, 4, 634014

E-mail: cristall2009@live.ru

**ROLE OF POLYMORPHIC VARIANTS OF *COMT* GENE IN PARKINSON'S DISEASE AND
LEVODOPA-INDUCED DYSKINESIAS PATHOGENESIS**

V.V. Tiguntsev, I.A. Zhukova

Scientific Supervisor: Prof., MD. S.A. Ivanova

Neurological Clinics of Siberian State Medical University

Mental Health Institute TNIMC, Russia, Tomsk, Aleutskaya st., 4, 634014

E-mail: cristall2009@live.ru

Abstract. *Parkinson's disease (PD) is one of the most serious and widespread neurodegenerative diseases. Genetic susceptibility plays a significant role in the development of PD. The aim of our study was to investigate associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of COMT gene coding dopamine catabolism enzyme and the Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesias. In this study seven SNPs (rs4680, rs6269, rs4633, rs4818, rs769224, rs165774, rs174696) within COMT have been genotyped in 232 patients with PD and 127 healthy individuals in Russian population of Siberia region. A significant association of the rs165774 polymorphism with PD and significant association of the rs4680 with levodopa-induced dyskinesia have been found. Our study confirms that the polymorphisms of COMT gene may play an important role in the pathophysiology of Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesias.*

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется гипокинезией с мышечной ригидностью, тремором покоя и последующей постуральной неустойчивостью, а также и немоторными нарушениями, включающими психические, вегетативные, сенсорные и диссомнические симптомы [1]. Ведущую роль в развитии БП играет генетическая предрасположенность, а также воздействие различных нейротоксинов, образующихся в самих дофаминовых нейронах, и свободных радикалов, приводящих к повреждению дофаминовых нейронов [2-4]. При лечении леводопой у пациентов могут возникать леводопа-индуцированные дискинезии (ЛИД), существенно снижающие качество жизни больных [4]. В метаболизме леводопы участвует фермент катехол-О-метилтрансфераза (COMT). Полиморфные варианты гена *COMT* могут оказывать влияние на активность этого фермента. Правильно подобранная доза препарата (с учётом активности COMT) может повысить эффективность терапии и избежать большинства побочных явлений.

Целью данной работы является изучение ассоциаций различных полиморфных вариантов гена катехол-О-метилтрансферазы с болезнью Паркинсона и развитием леводопа-индуцированных

двигательных побочных эффектов.

Материал и методы исследования. Критериями включения больных в исследуемую группу являлись: установленный диагноз болезнь Паркинсона (G20), длительное применение терапии леводопой, добровольное согласие на участие в исследовании. На всех пациентов заполнялась шкала патологических непреднамеренных движений (Abnormal Involuntary Movement Scale, AIMS). У каждого пациента оценивалось наличие или отсутствие орофациальной, тораколумбальной и общей дискинезии. Было обследовано 232 пациента с болезнью Паркинсона в соответствии с диагностическими критериями МКБ–10, проходивших курс стационарного лечения в неврологической клинике СибГМУ города Томска. В исследуемую группу вошли 149 женщин и 83 мужчины, получающих леводопу, средний возраст которых составил $68,7 \pm 7,6$ лет. Средний возраст начала заболевания у исследуемых пациентов составил $60,1 \pm 9,5$ года, средняя длительность заболевания - $9,8 \pm 5,6$ года. В зависимости от наличия побочных эффектов пациенты были разделены на две группы: 58 больных с леводопа-индуцированной дискинезией и 155 пациентов без неё. Контрольная группа была представлена 127 психически и соматически здоровыми добровольцами. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови стандартным фенол–хлороформным методом. Для исследования были выбраны 7 полиморфных вариантов гена *COMT* (rs4680, rs6269, rs4633, rs4818, rs769224, rs165774, rs174696). Определение аллельных вариантов проводили методом real-time PCR со специфическими праймерами с использованием наборов SNP Genotyping Assay на приборе StepOnePlus (США). Статистическая обработка проводилась при помощи программы SPSS 17.0. Распределение частот генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. Сравнение частот генотипов и аллелей в исследуемых группах проводили по критерию χ^2 , рассчитывали отношения шансов, 95% доверительные интервалы (OR, 95% CI) и относительные риски.

Результаты. При сравнении распределений генотипов полиморфного варианта rs165774 выявлены статистически значимые ($p=0,05$, $\chi^2=6,09$) различия (рис. 1). Генотип AA встречается значительно реже у пациентов с болезнью Паркинсона по сравнению со здоровыми индивидами и примерно в 3 раза ($OR=0,36$) уменьшает шансы развития данного заболевания.

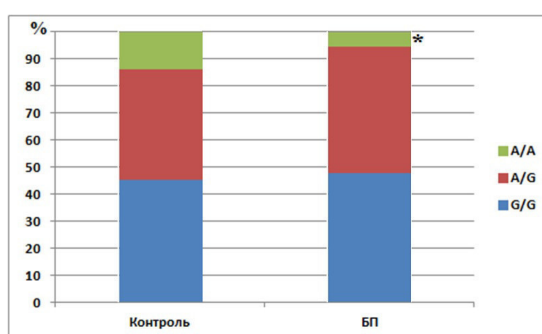


Рис. 1. Распределение частот генотипов полиморфизма rs165774 гена *COMT* у пациентов с болезнью Паркинсона и здоровых индивидов

Сравнение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов гена *COMT* выявило статистически значимые различия ($p=0,049$, $\chi^2=6,05$) по полиморфизму rs4680 между пациентами с наличием и отсутствием общей дискинезии (рис. 2), различия по орофациальной и тораколумбальной дискинезиям не обнаружены.

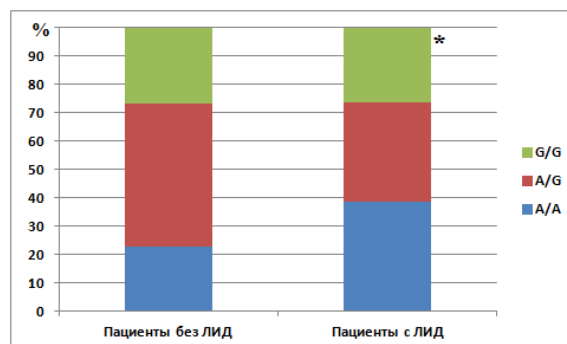


Рис. 2. Распределение частот генотипов полиморфизма rs4680 гена *COMT* у пациентов с общей ЛИД и без неё

Для всех генотипов и аллелей исследуемых полиморфных вариантов гена *COMT* был рассчитан показатель «отношение шансов». Для генотипа AA полиморфизма rs4680 он составляет 2,14, а для генотипа AG - 0,53. Генотип AA встречается значительно чаще у пациентов с болезнью Паркинсона по сравнению со здоровыми индивидами и более чем в 2 раза увеличивает риск развития данного побочного эффекта. Генотип AG оказывает протективный эффект, поскольку встречается у пациентов с двигательными расстройствами вдвое реже, чем у пациентов без них.

Выводы. В нашем исследовании выявлена ассоциация полиморфизма rs165774 гена *COMT* с болезнью Паркинсона в русской популяции пациентов. Миссенс-мутация (полиморфизм rs4680) ассоциирована с развитием леводопа-индуцированной дискинезии у пациентов с болезнью Паркинсона, что подтверждает участие гена катехол-О-метилтрансферазы в развитии исследуемых побочных эффектов терапии.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-35-00023 «Лаборатория фармакогенетических исследований персонализированной терапии психических и нейродегенеративных расстройств».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жукова И.А., Жукова Н.Г., Алифирова В.М., Гашилова Ф.Ф. Когнитивные расстройства и качество жизни пациентов с болезнью Паркинсона // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – Т. 7. - № 5-1. – С. 145–149.
2. Alonso-Navarro, H., Jimenez-Jimenez, F. J., Garcia-Martin, E., Agundez, J. A. G. (2014) Genomic and Pharmacogenomic Biomarkers of Parkinson's Disease. *Current Drug Metabolism*, no. 15, pp. 129–181.
3. Subramaniam, S. R., Chesselet, M.-F. (2013) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol*, no 106-107, pp. 17-32.
4. Ivanova, S. A., Loonen, A. J. M. (2016) Levodopa-Induced Dyskinesia Is Related to Indirect Pathway Medium Spiny Neuron Excitotoxicity: A Hypothesis Based on an Unexpected Finding. *Parkinson's Disease*, vol. 2016, 5 pages, doi:10.1155/2016/6461907.

**КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ
ГЕМАТУРИИ МЕТОДАМИ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ И АТОМНО-СИЛОВОЙ
МИКРОСКОПИИ**

В.П. Толстоухова, М.Н. Семенова

Научный руководитель: доцент, к.ф.-м.н С.Н.Мамаева

Северо-Восточный федеральный университет им.М.К. Аммосова,

Россия, г.Якутск, ул. Кулаковского, 48, 677000

E-mail: leratol96@mail.ru, semenova9519@mail.ru

**INTEGRATED RESEARCH ERYTHROCYTE OF CHILDREN'S BLOOD WITH THE SYNDROME OF
HEMATURIA BY SCANNING ELECTRON AND ATOMIC-POWERED MICROSCOPY**

V.P. Tolstoukhova, M.N. Semyonova

Scientific Supervisor: Docent, PhD in Phys-math sciences S.N. Mamaeva

North-Eastern Federal University, Russia, Yakutsk, Kulakovskogo str., 48, 677000

E-mail: leratol96@mail.ru, semenova9519@mail.ru

Abstract. *In this work, which based on empirical data researches of children's blood smears with the syndrome of hematuria, obtained by scanning electron microscopy, processing and analysis of the results were carried by the methods of mathematical statistics. During the processing of these results the basic statistical descriptions of the linear sizes erythrocytes and other biological objects discovered were calculated.*

Введение. Актуальность. В последнее время в республике Саха (Якутия) наблюдается тенденция роста почечных заболеваний среди детей с синдромом макрогематурии, в том числе хронический гломерулонефрит и болезнь Берже, которые впоследствии часто приводят к хронической почечной недостаточности больных и инвалидизации [1-3]. Существуют проблемы отсутствия методов ранней диагностики этих заболеваний, а также исследований их на молекулярном уровне. Поэтому изучение морфологии эритроцитов и других объектов в мазках крови при гематурическом синдроме являются необходимым для формирования новых методов диагностики почечных заболеваний с применением высокотехнологичного оборудования. **Цель:** Исследование эритроцитов крови детей с синдромом гематурии при помощи растровой электронной атомно-силовой микроскопии с применением математической статистики для обработки экспериментальных данных.

Практическая часть. Материалы и методы исследования. Исследованы мазки крови детей, больных с синдромом гематурии. Исследование проводилось на базе Республиканской больницы №1 – Национального центра медицины города Якутска. На данном этапе были исследованы более 20 человек, из 4 – больных IgA-нефропатией, 2 – с хроническим гломерулонефритом, 2 – тубулоинтерстициальный нефрит, и 6 – не имеющих синдрома гематурии, составляющих контрольную группу.

В данной работе предлагается новый метод исследования морфологии клетки и выявления неидентифицированных нанообъектов с помощью растрового электронного микроскопа (РЭМ) высокого разрешения JSM-7800F (Japanese Electron Optics Laboratory, JEOL, Япония) [4] и атомно-силового микроскопа (АСМ) Solver Next фирмы NT-MDT.

Изображение мазка крови ребенка на РЭМ из: контрольной группы (рис.1а) и с синдромом гематурии (рис.1б). На рисунке 2 представлена поверхность эритроцита с увлечением $\times 10.000$ раз в случае

хронического гломерулонефрита. А на рисунке 3 РЭМ- изображение нанометровых частиц на поверхности эритроцита образца крови, при увеличении $\times 20.000$ раз с указанием их размеров.

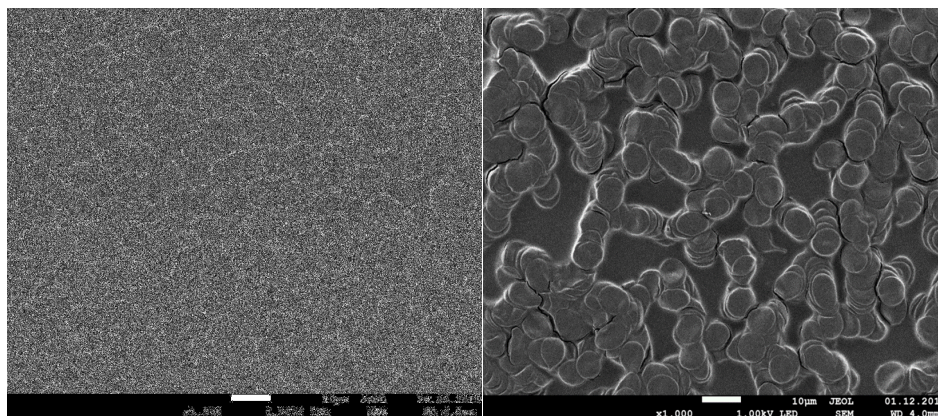


Рис. 1а. Мазка крови из контрольной группы

Рис. 1б Мазка крови с синдромом гематурии

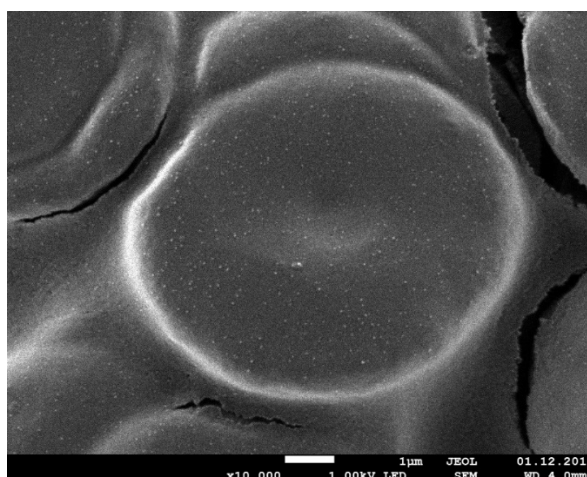


Рис.2. Поверхность эритроцита с хроническим гломерулонефритом

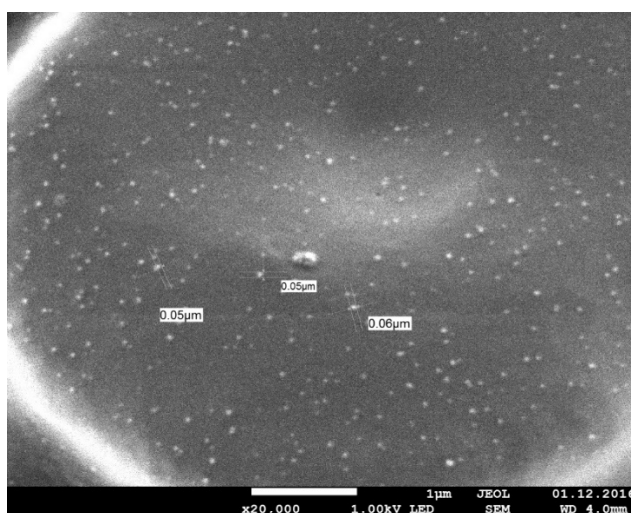


Рис.3. РЭМ- Изображение нанометровых частиц

Заключение. Исследование на растровом электронном микроскопе JEOL JSM-7800F такого объекта, как образец мазка крови, показало, что при определенных заболеваниях наблюдаются нанообъекты на поверхности эритроцитов, что было невозможно обнаружить при исследованиях на электронных микроскопах более раннего поколения. Можно предположить, что эти объекты имеют органическое происхождение, так как многие органические объекты являются диэлектриками и при изучении с помощью РЭМ они могут быть видны как яркие светящиеся объекты. Нанообъекты имеют размеры в среднем от 45-50 нм и от 100-200 нм, сходные с размерами малых вирусов и крупных вирусов [8,9] и могут являться подтверждением предположения о возможном вирусном этиологическом факторе заболевания Берже и других видов нефропатий. Выявление методом РЭМ уменьшения количества наноструктур на поверхности эритроцитов случае хронического гломерулонефрита до и после лечения вносит существенный вклад в формировании нового метода диагностики данного сложно диагностируемого заболевания. Дальнейшее увеличение статистики и анализ объектов нанометровых размеров расширит знания о проявлениях заболевания и принесет свой вклад в методах диагностики заболеваний с синдромом гематурии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Аткинс Р. Ж. Гломерулонефриты // Нефрология и диализ. 2000; Т.2; №4: с. 225–229.
2. Нефрология: национальное руководство/ Под ред. Н. А. Мухина, 2009. – 720с.
3. Feehally J., Cameron J. S. IgA Nephropathy: Progress Before and Since Berger // Am. J. Kidney Diseases. 2011. V. 58(2). P. 310–319.
4. Официальный сайт компании JEOL. URL: http://jeolrus.com/products/d_products/jsm-7800f/index.html (дата обращения: 20.02.2015).
5. У. Жу, Ж. Л. Уанга. М. Растровая электронная микроскопия для нанотехнологий. Методы и применение. БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 582 с.
6. Новодержкина, Ю.К. Конфигурация и поверхность клеток в норме и патологии / Ю.К. Новодержкина, З.Г. Шишканова, Г.И. Козинец. – М.: Триада-фарм, 2004. – 152 с
7. Физиология крови, Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2007. – 324 с.
8. Погорелов, В.М. Диагностическая значимость морфологических особенностей эритроцитов в мазках периферической крови / В.М. Погорелов, Г.И. Козинец // Гематология и трансфузиология. – 2005. – Т. 50, № 5. – С. 13-17.
9. Living blood cells and their ultra structure /M. Bessis. – Berlinheidelberg. – N. Y., 1973. – 767 p.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МИКРОРНК
В ОТВЕТ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО**

Л.А. Умарова, А.А. Пономарева, А.Ю. Добродеев

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Н.В. Чердынцева

Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

E-mail: umarova_laura95@mail.ru

**INVESTIGATION OF CHANGES IN LEVEL OF CIRCULATING MICRORNAS
IN RESPONSE TO LUNG CANCER TREATMENT**

L.A. Umarova, A.A. Ponomaryova, A.Yu. Dobrodeev

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

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

E-mail: umarova_laura95@mail.ru

Abstract. *Expression levels of cancer-associated microRNAs were reported to be altered in serum/plasma samples from lung cancer patients compared with healthy subjects. The purpose of this study was to estimate the value of 5 selected miRNAs plasma levels as markers of response to antitumor therapy in lung cancer patients. Expression levels of miR-19b, miR-126, miR-25, miR-205, miR-125b have been evaluated by quantitative reverse transcription PCR versus control miR-16 in blood plasma samples from 23 lung cancer (LC) patients. Plasma samples were obtained from LC patients before treatment, within 30 days after completing two courses of chemotherapy and 15 days after surgery. Repeated Measures ANOVA demonstrated that miR-19b expression levels were decreased in PC and increased in PO samples. These changes were characterized by a significant quadratic trend ($P = 0.03$). Expression levels of miR-125b increased both after chemotherapy and again after surgery and demonstrated a significant linear trend ($P = 0.03$). The miR-125b/miR-19b ratio changed during the course of the antitumor treatment with a significant linear trend ($P = 0.04$). Individual analysis in the groups of patients with partial response to chemotherapy and patients with stable or progressive disease showed different trends for miR-19b, miR-125b and miR-125b/miR-19b ratio between the groups. Dynamic change of trends for miR-19b and miR-125b expression levels and miR-125b/miR-19b ratio in the blood plasma have shown a potentiality to discriminate types of response to antitumor therapy in lung cancer patients. Further in-depth investigation is needed to establish a direct link the miRNAs expression levels in blood plasma with therapy response.*

Введение. МикроРНК – это короткие некодирующие молекулы РНК, которые осуществляют посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов. МикроРНК, присутствующие в биологических жидкостях известны как «циркулирующие», они могут играть роль диагностического биомаркера при различных онкологических заболеваниях, в том числе при раке легкого (РЛ) [1]. Известно, что микроРНК в крови обладают высокой стабильностью в плазме и устойчивостью к рибонуклеазам, к неблагоприятным физическим условиям. Такие их свойства позволяют эффективно выделить циркулирующие микроРНК и измерить их с высокой специфичностью и чувствительностью [2]. Показано, что уровень экспрессии некоторых микроРНК, в частности микроРНК-19b, -25, -126, -21, -205,

- 183, -210, -486, -223, -125б, существенно изменяется в плазме/сыворотке крови больных раком легкого (РЛ) по сравнению со здоровыми донорами. Целью настоящего исследования явилась оценка значимости изменений уровня микроРНК-19б, -25, -126, -205, -125б плазмы крови как маркеров ответа на противоопухолевую терапию и маркеров прогноза выживаемости у больных РЛ [3].

Материалы и методы. В исследование было включено 30 больных РЛ ($T_3N_{1-3}M_0$), с морфологически верифицированным диагнозом, в возрасте 40-75 лет, находившихся на лечении в клинике НИИ онкологии. Материалом для исследования послужила венозная кровь, которая забиралась до лечения, после 2 курсов химиотерапии и на 10-15 сутки после операции. Образцы крови разделяли на плазму и клетки крови. МикроРНК из плазмы крови выделяли с помощью метода, основанного на фенол-хлороформной экстракции [4]. Плазму крови инкубировали с однофазным экстракционным раствором. Тотальную микроРНК очищали на стекловолокнистых фильтрах (BioSilica Ltd, г. Новосибирск, Россия), затем проводили переосаждение РНК с использованием гликогена и растворение в воде (без РНК-аз). Реакцию обратной транскрипции проводили по методике, описанной ранее [5]. Каждую реакцию проводили в конечном объеме 10 мкл, содержащем 3 мкл РНК, 50 нМ специфического праймера для каждой микроРНК, 1 U ингибитора RiboLockRNAse (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 100 U MMLV обратной транскриптазы (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 × MMLV буфер и 250 мкМ dNTP. Условия реакции были следующими: 16°C – 30 мин, 42°C – 30 мин, 70°C – 10 мин. Далее полученную кДНК использовали для постановки количественной TaqMan ПЦР. Каждую реакцию ставили в общем объеме 30 мкл, содержащем компоненты: 2,5 мкл продукта реакции обратной транскрипции, 1,25 U Taq ДНК полимеразы (BiolabMix, Россия), 1× ПЦР-буфер, 4 мМ $MgCl_2$, 250 мкМ dNTP, 600 нМ прямой праймер, 800 нМ универсальный обратный праймер и 300 нМ специфической TaqMan пробы. Амплификацию проводили в течение 50 циклов в следующем режиме: 95°C – 15 сек, 60°C – 60 сек. Уровень экспрессии микроРНК рассчитывали по методу dCt. В качестве внутреннего стандарта использовали микроРНК-16, уровень экспрессии которой относительно стабилен [6].

Результаты. Согласно полученным данным установлено, что изменения уровня экспрессии микроРНК-19б в плазме крови пациентов на этапах динамического наблюдения при проведении противоопухолевой терапии характеризуются значимым квадратичным трендом ($p = 0,03$). Уровень экспрессии микроРНК-125б значимо повышается и характеризуется линейным трендом ($p = 0,03$) (табл. 1).

Таблица 1

Сравнение уровня циркулирующих микроРНК в плазме крови больных РЛ до и после проведенного лечения методом ANOVA: Тест внутрисубъектных эффектов и анализ трендов

МикроРНК	dCt средние значения (а-б-в)*	Тест внутрисубъектных эффектов (сферичность)		Анализ трендов (линейный)		Анализ трендов (квадратичный)	
		F	P	t	P	t	p
микроРНК-19б	1,3 – 2,7 – 1,5	4,28	0,03	0,54	0,60	-2,48	0,03
микроРНК-126	1,3 – 1,2 – 1,1	0,36	0,70	-0,66	0,52	0,29	0,77
микроРНК-25	2,2 – 1,9 – 1,9	0,53	0,60	-0,78	0,45	0,61	0,55

микроРНК-205	9,4 – 9,1 – 8,8	0,61	0,55	-1,10	0,29	0,01	0,99
микроРНК-125b	12 – 11 – 11	4,23	0,03	-2,44	0,03	1,43	0,18
микроРНК-125b/микроРНК-196	11 – 8,6 – 9,0	3,33	0,05	-2,27	0,04	1,50	0,16

Примечание: * - средние значения dCt для исследуемых микроРНК, рассчитанные для образцов плазмы крови больных РЛ до лечения (а), после химиотерапии (б) и после операции (в); р - уровень значимости.

Отношение микроРНК-125б/196 значительно изменяется в образцах плазмы крови, собранных после химиотерапии и после операции, и при этом характеризуется линейным трендом ($p = 0,04$). В ходе анализа отдельных групп пациентов в зависимости от ответа на химиотерапию (с частичной регрессией – группа 1 и со стабилизацией или прогрессией – группа 2) выявлены также разные тренды экспрессии микроРНК-196, -125б и микроРНК-125б/микро-196 между этими группами. Кроме того, выявлена значимая положительная корреляция между изменениями уровня экспрессии циркулирующих микроРНК-25 и микроРНК-205 в плазме крови больных РЛ (общая группа) ($r = 0,751$, $p < 0,0001$). Показана ассоциация изменений отношения микроРНК-125б/микро-196 с показателями общей выживаемости у больных РЛ (long-rang тест, $p < 0,04$).

Заключение. Таким образом, динамические изменения трендов уровня экспрессии микроРНК-196, микроРНК-125б и микроРНК-125б/микро-196 свидетельствуют о потенциальной возможности использования данных показателей как маркеров предсказания ответа на противоопухолевое лечение. Представляются перспективными дальнейшие исследования с целью оценки прямой связи между уровнем экспрессии микроРНК в плазме крови с ответом на терапию и выживаемостью у больных РЛ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Monteys A. M., Spengler R. M., Wan J., Tecedor L., Lennox K. A., Xing Y., Davidson L. (2010) Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *Rna*, no. 16(3), pp. 495–505.
2. Allegra A., Alonci A., Campo S., Penna G., Petrungaro A., Gerace D., Musolino C. (2012) Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *International Journal of Oncology*, no. 41(6), pp. 1897–1912.
3. Xing L., Su J., Guarnera M. A., Zhang H., Ling C., Zhou R., Sanford A. (2015) microRNA biomarkers for identifying lung cancer in indeterminate solitary pulmonary nodules. *Clinical Cancer Research*, no. 21(2) pp. 484–489.
4. Wu C., Cao Y., He Z., He J., Hu C., Duan H., Jiang J. (2014) Serum levels of miR-19b and miR-146a as prognostic biomarkers for non-small cell lung cancer. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, no. 232, pp 85-95.
5. Boldrini L., Giordano M., Servadio A., Ali G., Cocco A., Lucchi M., Bertoglio P., Melfi F., Mussi F., Fontanini G. (2014) Prognostic role of miR-205 in early stage (T1N0) non-small cell lung cancer. *Advances in lung cancer*, no. 3, pp. 45-51.
6. Ulivi P., Zoli W. (2014) miRNAs as non-invasive biomarkers for lung cancer diagnosis. *Molecules*, no. 19, pp. 8220-8237.

**ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 НА ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ
ПРОЦЕССЫ В КУПРИЗОНОВОЙ МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА**

Д.А. Федоришин

Научный руководитель: профессор, д.б.н. М.Ю. Ходанович
Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050
E-mail: khodanovich@mail.tsu.ru

**EFFECTS OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 ON PATHOLOGIC PROCESS IN THE
CUPRIZONE MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS**

D.A. Fedorishin

Scientific Supervisor: Prof., Dr. M.Y. Khodanovich
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050
E-mail: khodanovich@mail.tsu.ru

Abstract. The study aimed to evaluate the effect of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) on the cuprizone-induced murine model of demyelination and accompanying astrogliosis. Demyelination was induced in 14 adult male mice by 0.3% cuprizone in drinking water. Five animals from the cuprizone-treated group received subcutaneous injections of IGF-1. Seven animals were used as a control group. The extent of demyelination was evaluated as a decrease of the size of the corpus callosum on T2-weighted images that were received using 11.7T animal MRI scanner. Brain sections were immunohistochemically stained for glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker of astrocytes. It was revealed the cuprizone caused extensive demyelination and astrogliosis. IGF-1 treatment restored the size of corpus callosum and the number of astrocytes in corpus callosum and anterior commissure to the control level.

Введение. Одним из наиболее распространённых демиелинизирующих заболеваний является рассеянный склероз (РС). При этом препараты, действие которых направлено на стимулирование процесса ремиелинизации в настоящее время находятся лишь на стадии экспериментального тестирования. В данном исследовании была использована купризоновая модель РС, которая наряду с демиелинизацией, главным образом, мозолистого тела, характеризуется астроглиозом даже в условиях отсутствия аутоиммунных процессов [1]. Цель исследования заключалась в изучении перспективности применения инсулиноподобного фактора роста 1 (ИПФР-1) для снижения выраженности патологических процессов в мозге, вызванных введением купризона.

Материалы и методы. Объектом исследования были 3 группы мышей-самцов линии C57Bl/6j в возрасте 8 недель, полученные из питомника НИИОХ им. Н.Н. Ворожцова (г. Новосибирск) – «Контроль» (N=7), «Демиелинизация» (N=5) и «ИПФР-1» (N=7). Демиелинизацию в группах «Демиелинизация» и «ИПФР-1» вызывали хроническим пероральным введением водного раствора купризона 0,3 % в течение 53 дней. Животным группы «ИПФР-1» дважды в неделю подкожно вводили ИПФР-1, животные других групп получали инъекции физраствора. На 53-й день животным под 1.5-2% изофлурановым было проведено МРТ сканирование головного мозга на сверхвысокопольном томографе

BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия), получены T2-взвешенные изображения. Эвтаназию животных проводили под эфирным наркозом методом транскардиальной перфузии 4% параформальдегидом. Мозг извлекался, проводилась криопротекция в 10% и 20% растворах сахарозы и заморозка в парах жидкого азота. Для оценки астроглиоза срезы мозга толщиной 10 мкм на криотоме HM525 (ThermoScientific, Germany) в зоне +0.38 mm от bregma, которые затем окрашивались иммуногистохимически антителами, имеющими сродство к глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP), маркеру астроцитов. Микрофотографии срезов, полученные на микроскопе AxioImager Z2 (Carl Zeiss, Germany), и T2-взвешенные изображения обрабатывали с помощью программы ImageJ. На T2-взвешенных изображениях подсчитывали площадь мозолистого тела, которое обводили вручную. Для подсчета количества астроцитов были выбраны области мозолистого тела размером 200x200 мкм, а также передние комиссуры в пределах естественных границ. Статистическая обработка осуществлялась при помощи программы Statistica 8.0 с помощью дисперсионного анализа и критерия Манна-Уитни.

Результаты. На T2-взвешенных изображениях отмечено значительное уменьшение площади мозолистого тела в группе «Демиелинизация» по сравнению с группой контроля. Статистический анализ выявил значимое уменьшение размера мозолистого тела, вызванного введением купризона по сравнению с контрольной группой ($p < 0.001$). Введение ИПФР-1 на фоне купризоновой интоксикации восстанавливало размер мозолистого тела до уровня контроля ($p > 0.05$).

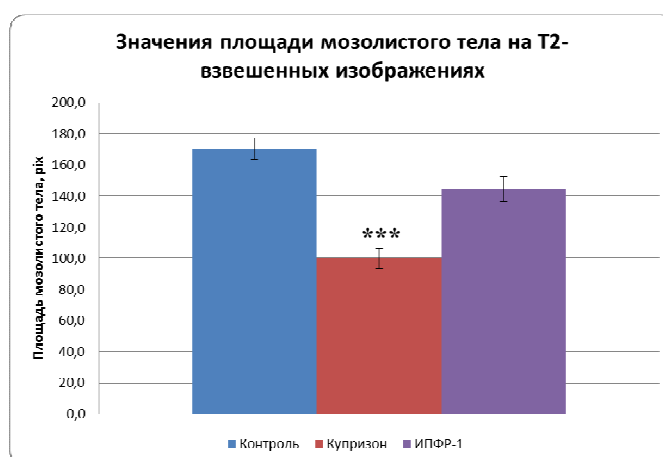


Рис. 1. – Размер мозолистого тела в группах «Контроль», «Демиелинизация» и «ИПФР-1».

Столбцы отражают значение среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Значимость различий относительно группы «Контроль»: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

В исследуемых структурах мозга животных группы «Демиелинизация» было обнаружено большое количество гипертрофированных астроцитов с большим количеством отростков, что свидетельствует о выраженной интоксикации купризоном. В группе «ИПФР-1» наблюдалось меньше гипертрофированных астроцитов, чем в группе «Демиелинизация». Статистический анализ выявил значимое увеличение количества астроцитов для группы «Демиелинизация» по сравнению с контрольной группой как в комиссурах ($p < 0.01$), так и мозолистом теле ($p < 0.01$). В то же время этот показатель не отличался от контроля для группы «ИПФР-1» ($p > 0.05$).

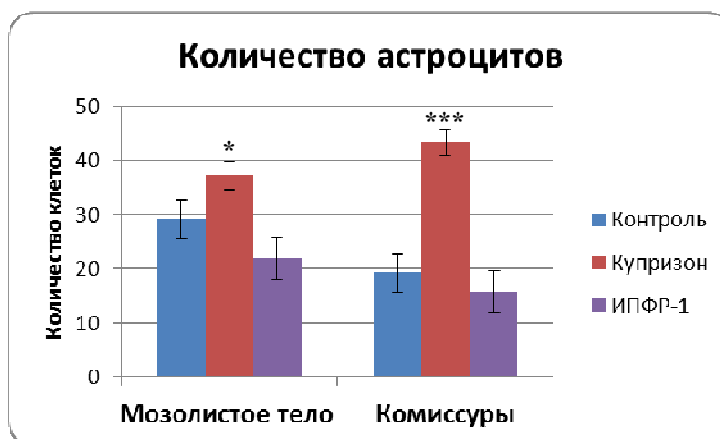


Рис. 2. – Различия в количестве астроцитов в мозолистом теле в группах «Контроль», «Демиелинизация» и «ИПФР-1». Столбцы отражают значение среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Значимость различий относительно группы «Контроль»: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

Известно, что ИПФР-1 обладает противовоспалительными свойствами и может повышать выживаемость и пролиферацию олигодендроцитов, способствуя ремиелинизации [2]. Предположительно, уменьшение количества активных астроцитов на фоне введения купризона, вызывающего астроглиоз, связано с нейропротективным и ремиелинизирующим действием ИПФР-1.

Заключение. Хроническая купризоновая интоксикация вызывала у мышей демиелинизацию, что выразилось в уменьшении размера мозолистого тела, а также увеличение количества астроцитов в мозолистом теле и передних комиссурах и изменении их морфологии. Введение ИПФР-1 на фоне купризоновой интоксикации оказывало позитивный эффект на демиелинизацию, увеличивая размер мозолистого тела до контрольных значений, и снижало вызванный купризоном астроглиоз в мозолистом теле и передних комиссурах.

Исследование проведено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-45-00040). Автор выражает благодарность сотрудникам НИИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН Сорокиной И.В. и Толстиковой Т.Г. за реализацию купризоновой модели рассеянного склероза, сотрудникам ИЦиГ СО РАН Акулову А.Е. и Ромащенко А.В. за проведение МРТ-исследования, сотрудникам лаборатории нейробиологии НИИ ББ ТГУ Немировичу-Данченко Н.М. и Глазачевой В.Ю. за помощь в проведении исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kipp M. The cuprizone animal model: new insights into an old story / M. Kipp, T. Clarner, J. Dang et al. // Acta Neuropathologica. – 2009. – V. 6. – № 118. – P. 723–736.
2. Hsieh J. IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes / J. Hsieh, J.B. Aimone, B.K. Kaspar // J. Cell Biol. – 2004. – V. 5. – № 164. – P. 111–122.

**ВАЛИДАЦИЯ СВЯЗИ ГЕННОГО ПОЛИМОРФИЗМА
С ПОВЫШЕННОЙ ЧАСТОТОЙ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ
У РАБОТНИКОВ РАДИАЦИОННОГО ПРОИЗВОДСТВА**

М. В. Халюзова

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

Северский биофизический научный центр ФМБА России

Россия, Томская обл., ЗАТО Северск, г. Северск, пр. Коммунистический, 87, 636039

E-mail: gedonna@yandex.ru

**THE VALIDATION OF THE ASSOCIATION BETWEEN GENE POLYMORPHISMS
AND THE CYTOGENETIC ABNORMALITIES FREQUENCY
IN THE COHORT OF RADIATION FACILITY EMPLOYEES**

M. V. Khalyuzova

Scientific Supervisor: Dr. N.V. Litviakov

Seversk Biophysical Research Centre

Russia, Tomsk Region, Seversk, Kommunistichesky av., 87, 636070

E-mail: gedonn@yandex.ru

Abstract. *The results from the research into the association between polymorphisms of genes-candidates for individual radiosensitivity and the frequency and spectrum of cytogenetic abnormalities are analyzed. These polymorphisms have been previously identified in our microarray studies using “Cancer_SNP_Panel GT-17-211” (“Illumina”, USA) in 2013. The study was conducted among Siberian Group of Chemical Enterprises healthy employees (n = 158) exposed to professional irradiation in a dose range of 100–300 mSv. We have found that 16 SNPs are associated with the frequency of dicentric and ring (the radiation exposure markers). We have found that 9 SNPs are confirmed to be associated with the frequency of dicentric (INSR rs1051690, TNKS rs33945943, CYP24A1 rs751087, GSK3B rs4624596, GSK3B rs4688046, GSK3B rs10934500, GSK3B rs1574154, GSK3B rs2873950, VCAM1 rs2392221) and 14 SNPs are confirmed to be associated with the frequency of ring (ESR1 rs488133, PIN1 rs889162, PIN1 rs2233679, CYP2C19 rs4986894, CYP24A1 rs751087, APAF1 rs2288729, MPDU1 rs4227, GSK3B rs4624596, GSK3B rs4688046, GSK3B rs10934500, GSK3B rs10934503, GSK3B rs1574154, GSK3B rs2873950, VCAM1 rs2392221).*

Введение. Известно, что основными цитогенетическими индикаторами радиационного воздействия являются нестабильные хромосомные аберрации (ХА), в частности, дицентрические и кольцевые хромосомы. Их повышенная индукция у отдельных индивидов при одинаковой дозе облучения может служить показателем индивидуальной радиочувствительности (ИРЧ). Для идентификации генетических маркеров, которые могли бы использоваться в качестве предикторов повышенной частоты индукции цитогенетических аномалии при долговременном контакте с ионизирующим излучением (ИИ), было проведено крупномасштабное (микрочиповое) исследование ассоциации однонуклеотидных полиморфных вариантов (single nucleotide polymorphisms – SNPs) с частотой и спектром ХА у работников Сибирского химического комбината (СХК), крупнейшего в мире

предприятия атомной отрасли, подвергавшихся длительному радиационному воздействию в диапазоне доз 100-300 мЗв [1]. Именно при этом диапазоне доз на дозовой кривой выхода хромосомных аномалий наблюдается плато, когда частота ХА не возрастает с повышением дозы облучения [2]. Объектом исследования явилась кровь 86 здоровых работников СХК, подвергавшихся долговременному радиационному воздействию в процессе профессиональной деятельности. ДНК из крови выделяли при помощи колоночного метода, наборами «QIAamp DNA MiniKit (50)» («Qiagen», Германия). Микрочиповое исследование ассоциации 1 262 SNPs с частотой и спектром ХА проводили при помощи «Cancer_SNP_Panel GT-17-211» («Illumina», США). Анализ полученных данных проводили с помощью программы «SNPassoc». В результате было идентифицировано 40 SNPs, ассоциированных с повышенной частотой различных типов ХА, из них 28 SNPs были связаны с повышенной частотой индукции дицентрических и кольцевых хромосом – маркеров радиационного воздействия [1].

Для подтверждения выявленных ассоциаций далее было проведено несколько серий валидационных исследований на расширенной выборке работников СХК подвергавшихся долговременному радиационному воздействию [3] в том числе и у работников, облученных в диапазоне 100-300 мЗв, итоги которых представлены ниже.

Материалы и методы исследования. Объектом для исследования служила ДНК крови 158 здоровых работников СХК, подвергавшихся радиационному воздействию в процессе профессиональной деятельности. Средняя доза внешнего облучения составила $176,9 \pm 4,07$ мЗв, медиана – 171,1 мЗв, интерквартильный размах – 136,7–207,3 мЗв. Для всех обследованных лиц был проведен стандартный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови. Генотипирование ДНК по всем 40 SNPs проводили методом ПЦР в режиме реального времени с праймерами оригинального дизайна.

Результаты. По результатам валидационного исследования обнаружено, что у носителей мутантного GG-генотипа гена *INSR* rs1051690 частота дицентрических хромосом в 3 раза выше, чем у носителей «дикого» и гетерозиготного генотипов ($p\text{-value} = 0,045$), в то время как у носителей мутантного AA-генотипа *TNKS* rs33945943 частота дицентрических хромосом выше в 2,4 раза ($p\text{-value} = 0,012$).

Для полиморфизма *CYP24A1* rs751087 была продемонстрирована сильная ассоциация с высокой частотой дицентрических и кольцевых хромосом. Установлено, что наличие мутантного GG-генотипа гена цитохрома P450 rs751087 увеличивает частоту дицентрических хромосом в 3,9 раза ($p\text{-value} = 0,0003$), а частоту кольцевых хромосом – в 3,1 раза ($p\text{-value} = 0,010$). Валидационное исследование 6 полиморфных вариантов гена *GSK3B* подтвердило выявленные ранее ассоциации с кольцевыми хромосомами, более того для пяти из шести SNPs также были показаны сильные ассоциации с повышенной частотой дицентрических хромосом. У носителей минорных генотипов по изученным SNPs частота кольцевых aberrаций выше, чем у носителей «диких» и гетерозиготных генотипов в 2,2–4,5 раза ($p\text{-value} = 0,0002\text{--}0,002$), а частота дицентрических хромосом – в 3,9–5 раз ($p\text{-value} = 0,0004\text{--}0,0001$). Также были валидированы сильные ассоциации *VCAM1* rs2392221 с частотой дицентрических и кольцевых хромосом. У носителей мутантного TT-генотипа частота дицентрических хромосом в среднем в 5 раз выше, чем у носителей «дикого» CC- и гетерозиготного CT- генотипов ($p\text{-value} = 0,007$), в то время как частота колец выше в 11,5 раза ($p\text{-value} = 0,0000$), что свидетельствует о возможности использования данного маркера для тестирования высокого уровня ИРЧ.

Валидационные исследования подтвердили связь *CYP2C19* rs4986894 с частотой кольцевых хромосом. У носителей минорного генотипа *CC* частота кольцевых хромосом выше, чем у носителей мажорного и гетерозиготного генотипов в 6,9 раза ($p\text{-value} = 0,00003$). Также подтверждена связь полиморфизма гена *ESR1* rs488133 с повышенной частотой кольцевых хромосом. У носителей мутантного аллеля *T* частота кольцевых хромосом выше, чем у носителей доминантного аллеля *C* в 3,9 раза ($p\text{-value} = 0,001$).

Настоящие исследования также подтвердили связь полиморфных вариантов rs889162 и rs2233679 гена *PIN1* с кольцевыми хромосомами. У носителей минорного аллеля *T* полиморфизма rs2233679 частота кольцевых хромосом выше, чем у носителей доминантного аллеля *C* в 3 раза ($p\text{-value} = 0,005$), в то время как у носителей редкого генотипа *AA* по полиморфизму rs889162 частота кольцевых хромосом выше в 3 раза ($p\text{-value} = 0,0000$). Валидационные исследования подтвердили и выявленную ранее ассоциацию полиморфизма *APAF1* rs2288729 с кольцевыми хромосомами. У носителей минорного генотипа *TT* частота кольцевых хромосом выше, чем у носителей мажорного *CC*- и гетерозиготного *CT*-генотипов в 2,7 раза ($p\text{-value} = 0,008$). Подтверждена ассоциация *MPDU1* rs4227 с повышенным уровнем кольцевых хромосом: у носителей мутантного генотипа *GG* наблюдалось повышение частоты кольцевых хромосом по сравнению с носителями «дикого» и гетерозиготного генотипов в 4 раза ($p\text{-value} = 0,0004$).

Заключение. Таким образом, на выборке работников, подвергавшихся радиационному воздействию в дозе 100–300 мЗв, удалось подтвердить установленные ранее ассоциации с повышенной частотой кольцевых и дицентрических хромосом для 16 из 28 SNPs. Их них 9 SNPs ассоциированы с повышенной частотой индукции дицентрических хромосом: rs1051690, rs33945943, rs751087, rs4624596, rs4688046, rs10934500, rs1574154, rs2873950, rs2392221. В то время как связь с повышенной частотой кольцевых aberrаций была валидирована для 14 SNPs: rs488133, rs889162, rs2233679, rs4986894, rs751087, rs2288729, rs4227, rs4624596, rs4688046, rs10934500, rs10934503, rs1574154, rs2873950, rs2392221. При этом 7 из 16 SNPs имеют связь как с дицентрическими, так и с кольцевыми хромосомами; 11 SNPs ассоциированы более чем с двумя типами ХА, что может свидетельствовать об общности механизмов их индукции при радиационном воздействии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Литвяков Н.В., Гончарик О.О., Фрейдин М.Б. и др. Оценка связи полиморфизмов генов с частотой и спектром цитогенетических аномалий у здоровых работников сибирского химического комбината, подвергавшихся радиационному воздействию (microarray исследования) // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т. 53. – № 2. – С. 137–150.
2. Литвяков Н.В., Фрейдин М.Б., Халюзова М.В. и др. Частота и спектр цитогенетических нарушений у работников Сибирского химического комбината // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2014. – Т. 54, – № 3. – С. 283–296.
3. Халюзова М.В., Литвяков Н.В., Сазонов А.Э. и др. Валидация результатов широкогеномного исследования связи полиморфных локусов с повышенной частотой маркёров радиационного воздействия // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13. – № 3. – С. 70–79.

**ШИРОКОГЕНОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ЯВЛЕНИЯ
ПОТЕРИ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

М.М. Цыганов, И.В. Дерюшева, М.К. Ибрагимова

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

¹НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный 5, 634050

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

E-mail: TsyganovMM@yandex.ru

**GENOMIC APPROACH IN THE RESEARCH PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF EFFECTS LOSS
OF HETEROZYGOSITY IN TUMOR TISSUE BREAST**

M.M. Tsyganov, I.V. Deryusheva, M.K. Ibragimova

Scientific Supervisor: Ph.D. N.V. Litviakov

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

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

E-mail: TsyganovMM@yandex.ru

Abstract. *One of the variability factors of malignant tumors, particularly breast cancer is a genetic variation due to gene polymorphism, and especially - the phenomenon of loss of heterozygosity (LOH). It has been shown that LOH in some genes could be a good prognostic marker. Thus, the aim of this work was genome-wide association study of loss of heterozygosity and Metastasis-free survival in breast cancer. The study involved 68 patients with breast cancer. To evaluate LOH status that was conducted by microarray analysis on high density DNA-chips made by firm Affymetrix CytoScanTM HD Array. 13 815 genes were evaluated in order to reveal loss of heterozygosity. The frequency of LOH varied from 0% to 63%. As a result of the associative analysis four genes EDA2R, PGK1, TAF9B and CYSLTR1 were determined, the presence of loss of heterozygosity that was associated with Metastasis-free survival. The presence of LOH in these genes is associated with low Metastasis-free survival.*

Актуальность. Для однонуклеотидных полиморфизмов (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) в опухолевой ткани характерно, так называемое, явление аллельного имбаланса (АИ) и его частный случай - потеря гетерозиготности (Loss of heterozygote - LOH), при котором происходит потеря одного из аллелей гетерозиготного генотипа и происходит уменьшение детектируемых частот гетерозиготных генотипов по сравнению с геномной ДНК. В предыдущих исследованиях было показано, что АИ может быть сопряжен с прогнозом больных раком молочной железы [1].

Большинство исследований потери гетерозиготности, в опухоли молочной железы сосредоточено на изучение данного феномена в рамках одного или нескольких генов, и, как правило, связаны с малигнизацией клеток железы [2]. При этом, LOH практически не изучалось в широкогеномном формате. Таким образом, **целью данной работы** явилось широкогеномное исследование связи потери гетерозиготности в опухоли молочной железы с безметастатической выживаемостью.

Материалы и методы. В исследование были включены 68 больных РМЖ IIА–IIВ стадии, с морфологически верифицированным диагнозом, в возрасте 28–68 лет. Все больные получали 2–4 курса неоадьювантной химиотерапии по схемам FAC, САХ или монотерапию таксотером. После пациентам проводилась операция, затем 2 курса адьювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. В качестве исследуемого материала были использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм³), взятые до лечения под контролем УЗИ. ДНК выделяли из 68 образцов с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany). Для оценки статуса LOH проведен микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности фирмы Affymetrix CytoScan™ HD Array. Для обработки результатов микрочипирования использовали программу «Chromosome Analysis Suite 3.1» (Affymetrix, USA). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0». Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера. Для анализа безметастатической и общей выживаемости использовались кривые выживаемости, построенные по методу Каплана-Майера.

Результаты и обсуждение. На первом этапе была изучена частота LOH в 13 815 генах OMIM. Частота LOH в отдельных генах изменялась от 0% до 63%. Стоит отметить, что наибольшая частота встречаемости явления потери гетерозиготности характерна для генов 17 и X-хромосом. В 6, 7, 11 и 14 хромосомах есть обширные участки, в которых LOH не наблюдалось ни в одном из 68 обследованных случаев (Рисунок 1).

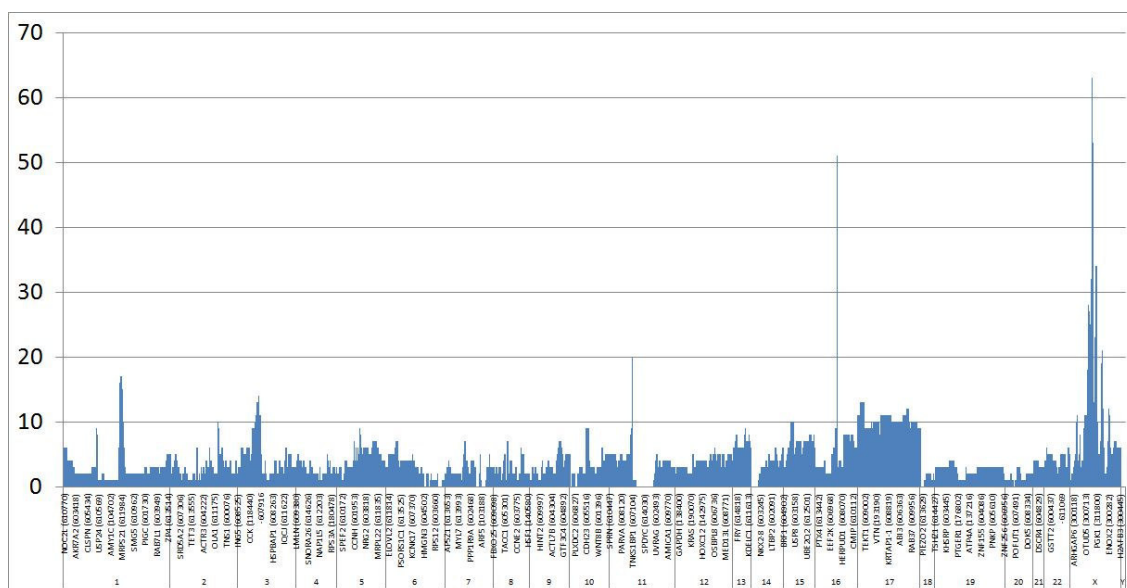


Рис. 1. Профиль встречаемости LOH в генах OMIM по локализации в хромосомах

На следующем этапе была исследована связь отдаленного метастазирования опухоли молочной железы с частотой LOH по всем генам OMIM. В результате проведенного исследования было установлено 7 таких генов: *FGD1*, *GNL3L*, *TRO*, *EDA2R*, *PGK1*, *TAF9B* и *CYSLTR1* (разность составили от 25,5 до 35,3%). После этого при помощи критерия Фишера была оценена связь наличия LOH с метастазированием. Она наблюдалась лишь у 4 из 7 генов: *EDA2R*, *PGK1*, *TAF9B* и *CYSLTR1*. И по методу Каплана-Майера у пациентов с наличием в опухоли молочной железы LOH данных генов

показатели безметастатической выживаемости статистически значимо ниже по сравнению с группой больных, у которых наблюдалась нормальное состояние данных генов (Рисунок 2).

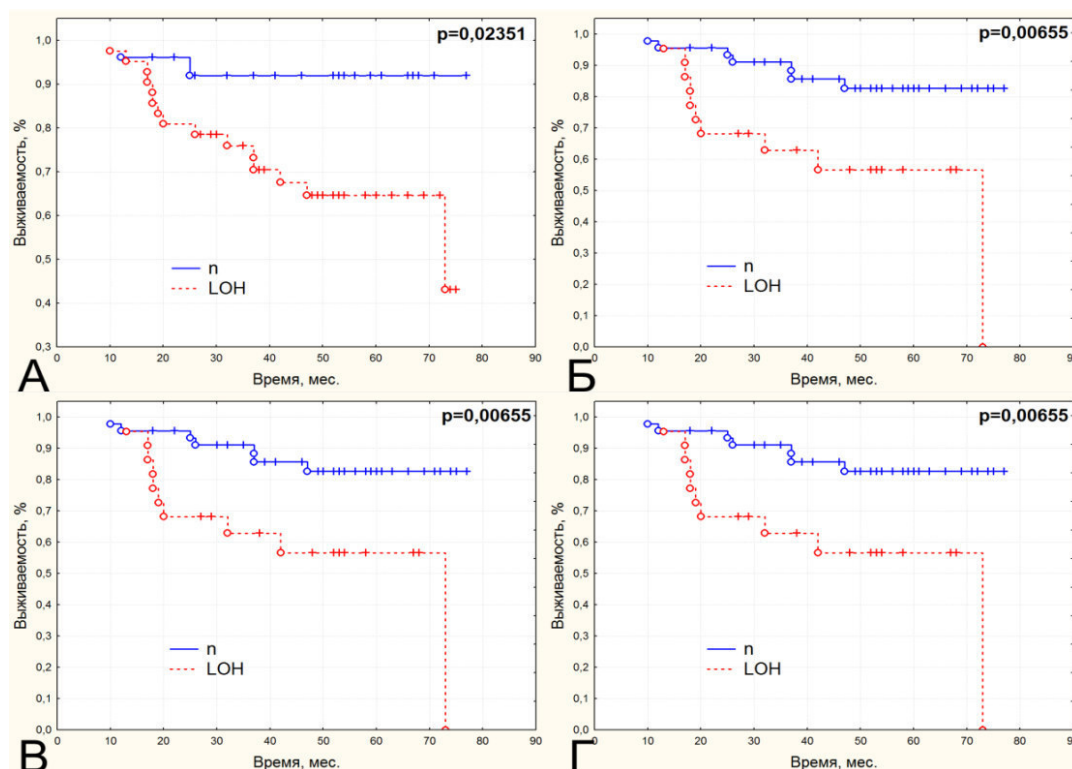


Рис. 2. Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от наличия потери гетерозиготности LOH: А – гена *EDA2R*; Б – гена *PGK1*; В – гена *TAF9B*; Г – гена *CYSLTR1*

Примечание: *p* – уровень статистической значимости по log-rank test

Стоит отметить тот факт, что все выявленные в ходе исследования гены локализованы в X хромосоме (<http://www.genecards.org/>). При этом ген *EDA2R* локализован в Xq12 длинного плеча хромосомы, тогда как все остальные гены *PGK1*, *TAF9B* и *CYSLTR1* в Xq21.1 длинного плеча X хромосомы.

Вывод. Таким образом, была показана связь наличия потери гетерозиготности в генах *EDA2R*, *PGK1*, *TAF9B* и *CYSLTR1* с безметастатической выживаемостью больных раком молочной железы, и это в дальнейшем, может быть использовано как маркер прогноза заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Цыганов М.М., Ибрагимов М.К., Дерюшева И.В. Широкогеномное исследование аллельного имбаланса в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии //Перспективы развития фундаментальных наук: Сборник научных трудов XII Международной конференция студентов и молодых ученых. - Томск, 2015. - Т. 1. - С. 892-894.
2. Chen, Y., Chen, C. (2008) DNA copy number variation and loss of heterozygosity in relation to recurrence of and survival from head and neck squamous cell carcinoma: a review. Head & neck, no. 30, pp. 1361-1383.

**РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ЗАРОДЫШЕВОЙ ФОРМЫ
ВИЧ-СПЕЦИФИЧНОГО ШИРОКО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА 10E8**

Д.С. Черникова

Научный руководитель: канд. биол. наук, А.А. Горчаков

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8/2, 630090

Новосибирский национальный исследовательский государственный Университет

Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090

E-mail: chern_ds@mcb.nsc.ru

**DESIGN OF A SENSOR CELL LINE BASED ON THE GERMLINE VERSION OF THE HIV-
SPECIFIC BROADLY NEUTRALIZING ANTIBODY 10E8**

D.S. Chernikova

Scientific Supervisor: Ph.D. A.A. Gorchakov

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS,

Russia, Novosibirsk, Acad. Lavrentiev Ave. 8/2, 630090

Novosibirsk National Research State University, Russia, Novosibirsk, Pirogova Str. 2, 630090

E-mail: chern_ds@mcb.nsc.ru

Abstract. Identification of antigens driving affinity maturation of broadly neutralizing antibodies is one of the most challenging endeavors in the HIV vaccine development field. In order to isolate such candidate immunogens and to analyze whether they may activate B-cells expressing BCRs based on immature/germline forms of broadly neutralizing antibodies, a robust test system that faithfully recapitulates human B-cell biology would be indispensable. Thus, developing a human B-cell sensor line with surface expression of a germline variant of broadly neutralizing antibody 10E8 may represent one of the possible solutions.

Актуальность. Создание эффективной вакцины против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1, далее ВИЧ) уже свыше тридцати лет является одной из самых актуальных, но, однако, до сих пор нерешенных задач инфекционной иммунологии. Все дело в том, что ВИЧ обладает уникальным набором свойств, защищающих его от воздействия клеток иммунной системы хозяина. Основным препятствием при разработке вакцины является огромное генетическое разнообразие вариантов ВИЧ. Так, большинство антител, появляющихся при ВИЧ-инфекции или иммунизации традиционными ВИЧ-антигенами, направлены против доминантных изменчивых эпитопов ВИЧ и являются специфичными к определенному вирусному изоляту. Вследствие этого, нейтрализующие свойства таких антител легко преодолеваются. Очевидно, что для эффективной защиты против ВИЧ-инфекции вакцина должна индуцировать образование антител, способных нейтрализовать максимальное разнообразие генетических вариантов вируса. Такие антитела, демонстрирующие высокую нейтрализующую способность, направлены против структурно-консервативных областей (так называемых областей уязвимости, необходимых вирусу для проникновения в клетку-мишень), и называются широко нейтрализующими антителами (broadly neutralizing antibodies, далее bnAb) [1]. Изучение гуморального иммунитета

зараженных ВИЧ людей показало, что появление данных антител наблюдается только у части ВИЧ-инфицированных и по прошествии длительного времени после проникновения вируса в организм (спустя 1-3 года), что связано с длительным путем созревания уникальных комбинаций зародышевых V-генов, соответствующих bnAb. Примечательно, что антигены ВИЧ не взаимодействуют с продуктами таких зародышевых форм bnAb и, как следствие, не способны стимулировать активацию и созревание соответствующих им крайне редких В-клеток [2]. Таким образом, в настоящее время механизм возникновения в организме bnAb не известен.

Данные наблюдения легли в основу новой стратегии создания вакцины против ВИЧ. Ее цель – получить путем иммунизации пул В-клеток, способных производить bnAb. В рамках данной стратегии вакцинации необходимо разработать серию иммуногенов, способных стимулировать пролиферацию В-клеток, экспрессирующих зародышевые формы bnAb, и обеспечить направленное созревание зародышевых предшественников в зрелые формы bnAb [3]. Как же узнать, стимулирует ли выбранный иммуноген размножение редких В-клеток, несущих зародышевые формы bnAb, и их «дозревание» исключительно в выбранном направлении, ведущем к образованию полноценных, зрелых bnAb?

Ввиду значительных отличий последовательностей V-генов, необходимых для развития bnAb, у человека и мыши, иммунизация лабораторных животных мало информативна для изучения развития иммунного ответа. С другой стороны, использование приматов крайне дорого. В связи с этим, мы считаем, что для оценки эффективности активации В-клеток выбранным иммуногеном необходимо создание тест-системы, максимально точно имитирующей биологию В-клеток человека. Такой клеточной моделью может служить В-клеточная линия-сенсор с поверхностной экспрессией зародышевой версии ВИЧ-специфичного широко нейтрализующего антитела в виде В-клеточных рецепторов.

Цель исследования. Целью данной работы являлось создание функциональной стабильной сенсорной линии с поверхностной экспрессией gl1E8, - зародышевой версии ВИЧ-специфичного широко нейтрализующего антитела 10E8. Выбор антитела 10E8 обусловлен тем, что оно обладает очень высоким нейтрализующим потенциалом: оно нейтрализует 97-99% разновидностей ВИЧ, что является одним из лучших показателей среди всех bnAb.

Для достижения данной цели в рамках работы были поставлены следующие задачи: во-первых, получить лентивирусную конструкцию для создания стабильной В-клеточной сенсорной линии, конститутивно экспрессирующей gl10E8 в формате мембран-ассоциированного IgG1; во-вторых, перенести лентивирусные конструкции в клетки В-клеточной лимфомы человека DG-75 для создания стабильной В-клеточной сенсорной линии с поверхностной экспрессией gl10E8 – DG-75(gl10E8); в-третьих, провести функциональное тестирование полученной сенсорной линии с поверхностной экспрессией gl10E8.

Экспериментальная часть. Первой задачей данной работы было получение путем многоэтапного молекулярного клонирования лентивирусной ДНК-конструкции, кодирующей сенсор на основе gl10E8. В качестве основы В-клеточного рецептора в нашей работе использованы константные части IgG1 (тяжелая цепь $\gamma 1$), а комбинациями VH- и VL-областей образованы антигенраспознающие области антитела gl10E8. В качестве основы целевой конструкции был использован лентивирусный вектор pCDH. Для получения вирусных частиц была проведена ко-трансфекция клеточной линии HEK293T

полученной лентивирусной конструкцией с паковочными плазмидами. Данные вирусные частицы затем использовались для трансдукции целевой клеточной линии В-клеточной лимфомы человека DG-75. Воспользовавшись тем, что в структуре лентивирусной конструкции присутствует ген устойчивости к зеоцину, была проведена селекция трансдуктантов на среде с этим антибиотиком.

Для оценки способности полученной сенсорной линии активироваться в ответ на кросс-сшивку В-клеточного рецептора был проведен Ca-flux анализ. Добавление к клеткам антител против иммуноглобулина G приводит к кросс-сшивке В-клеточных рецепторов и активации клетки за счет мобилизации ионов кальция из внутриклеточного депо, что регистрируется с помощью специального кальций-чувствительного флуоресцентного зонда. По результатам проведенного эксперимента сенсорная линия была успешно активирована.

Результаты. В результате проделанной работы была получена стабильная функциональная В-клеточная линия с поверхностной экспрессией зародышевой формы ВИЧ-специфичного широко нейтрализующего антитела 10E8. Полученная сенсорная линия используется нами для тестирования невирусных иммуногенов, взаимодействующих с зародышевой формой широко нейтрализующего антитела 10E8. При инкубации кандидатного иммуногена с сенсорной линией о наличии или отсутствии взаимодействия можно судить, используя FACS-анализ. Одновременно способность иммуногенов активировать В-клетки, несущие на поверхности зародышевую форму bnAb, можно оценить, используя метод Ca-flux.

Заключение. Использование сенсорной линии DG-75(g110E8) обладает следующими преимуществами перед «классическими» системами: эта *in vitro* система максимально близко воспроизводит основные молекулярные события, происходящие при антиген-индуцированной активации и созревании В-клеток человека, она экономична, высокопроизводительна и, что немаловажно, позволяет проводить отбор иммуногенов любой природы. Создание сенсорной линии с поверхностной экспрессией зародышевой формы ВИЧ-специфичного bnAb 10E8 является первым важным шагом в создании целой линейки сенсорных линий, необходимых для разработки полного набора кандидатных иммуногенов, способных стимулировать не только g110E8, но также аффинное созревание широко нейтрализующих антител в зрелую форму 10E8, которая позволит эффективно уничтожать ВИЧ и тем самым предотвращать заражение.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект № 16-04-00915).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mouquet H. (2014). Antibody B cell responses in HIV-1 infection. Trends Immunol, v. 35, no. 11, pp. 549-561.
2. Xiao X., Chen W., Feng Y., Zhu Z. (2009). Germline-like predecessors of broadly neutralizing antibodies lack measurable binding to HIV-1 envelope glycoproteins: implications for evasion of immune responses and design of vaccine immunogens. Biochem Biophys Res Commun, v. 390, no. 3, pp. 404-409.
3. Haynes B. F., Kelsoe G., Harrison S. C., Kepler T. B. (2012) B-cell-lineage immunogen design in vaccine development with HIV-1 as a case study. Nat Biotechnol, v. 30, no. 5, pp. 423-433.

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ МОНОЦИТОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И
ПРОГРАММИРОВАНИЯ *IN VITRO***

А.С. Шляхтун¹, И.В. Митрофанова^{1,2}, Е.Г. Шаповалова¹

Научный руководитель: д.м.н. Чурина Е.Г

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

²Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,

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

E-mail: lonelynw59@gmail.com

**OPTIMIZATION OF MONOCYTE ISOLATION METHOD FOR CULTURING AND
PROGRAMMING *IN VITRO***

A.S. Shlyahzun¹, I.V. Mitrofanova^{1,2}, Ye.G. Shapovalova¹

Scientific Supervisor: Dr. Churina E.G.

¹National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin Str., 36, 634050

²Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,

Russia, Tomsk, Kooperativny Str., 5, 634009

E-mail: lonelynw59@gmail.com

Abstract. *Monocytes are considered to be precursors of the mononuclear phagocytes system. Due to the wide variety of macrophages functions nowadays investigation of monocytes and macrophages functions, properties and reactions is one of the most actual. The aim of the study was to choose and optimize a method of monocyte isolation from healthy donors. The result of our research as supposed was to receive the maximum number of cells with a purity that allows to carry out functional tests in vitro and to evaluate the expression of monocyte genes of interest. As a result, the protocol of monocyte isolation from human peripheral blood with CD14-positive selection with magnetic separation (MACS) was held. Optimal concentrations of cytokines for monocyte stimulation and for modelling monocyte properties in vitro in cell culture were found for further researches.*

Введение. Моноциты считаются клетками-предшественниками системы мононуклеарных фагоцитов, а макрофаги – одним из основных членов этой клеточной системы, выполняющим многообразные и многоплановые функции в поддержании целостности организма путем непосредственного участия в ликвидации патогена либо восстановления тканей при развитии воспалительных реакций в ответ на повреждение. В связи с этим наиболее актуальными на сегодняшний день являются исследования функций и реакций моноцитов и макрофагов в ответ на введение в организм имплантатов различного рода, при опухолевых и воспалительных заболеваниях для получения информации о возможности применения тех или иных материалов в живых организмах. Для проведения комплекса исследований необходимо выделение моноцитов как отдельной фракции крови. Однако для достижения достаточной чистоты выделяемой фракции и высокого показателя выживаемости моноцитов необходим тщательный подбор условий сбора и культивирования клеток (правильный выбор метода), что и являлось целью данного исследования.

Задачей работы являлись подбор и оптимизация метода выделения моноцитов от здоровых доноров. Результатом работы предполагалось получение максимально возможного количества клеток с чистотой, позволяющей провести функциональные пробы в культуре клеток *in vitro* и оценить экспрессию интересующих генов моноцитов.

Материалы и методы. Моноциты выделяли из побочных продуктов приготовления консервов крови – лейкоцитной пленки: разводили пленку буфером PBS, не содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} (Biochrom), в соотношении 1:1, полученную суспензию (35 мл) наслаивали на 15 мл фикола плотности 1.077 (Biochrom) в пробирке Leucosep™ (Greiner). Образцы центрифугировали 30 мин (Beckman Coulter) при 650g. Мононуклеарную фракцию собирали с интерфазы фикола/сыворотка, переносили в свежие пробирки и два раза отмывали буфером PBS. Во время первого центрифугирования готовили непрерывный градиент на основе перколла (Percoll™ GE Healthcare). Для приготовления одного градиента смешивали 13,5 мл перколла, 1,5 мл 10 х минимальной основной среды Эрла, 15 мл среды Спиннера. Предыдущие пробирки промывали 4 мл PBS и содержимое вливали в пробирки со вторым градиентом. Полученные растворы центрифугировали при 420 gcf в течение 30 минут без перерывов. Верхний слой (PBS) и промежуточный слой (моноциты) отбирали в колбу объемом 50 мл, хорошо перемешивали, доводили объем смеси до 50 мл раствором PBS и центрифугировали при 420 gcf в течение 10 минут. Супернатант удаляли. Клеточный осадок ресуспендировали в 3 мл PBS и переносили в 15 мл пробирки. 50-миллилитровую пробирку промывали 4 мл раствора PBS, содержимое добавляли к смеси в 15-миллилитровой колбе и доводили объем раствором PBS до 10 мл. Клетки подсчитывали и центрифугировали при 420 gcf в течение 10 минут с перерывом. Клеточный осадок ресуспендировали в предварительно охлажденном MACS-буфере с добавлением микрогранул CD14 (95 мкл буфера и 5 мкл микрогранул). MACS-буфер готовили растворением 2,5 г бычьего сывороточного альбумина в 500 мл ФСБ и добавлением 2 мл 0,5М раствора ЭДТА, полученную смесь отфильтровывали в стерильную колбу. Полученную смесь инкубировали в течение 20 минут на ротаторе при температуре 4°C. Затем в пробирки добавляли MACS-буфер до 10 мл и полученную смесь центрифугировали при 420 gcf в течение 10 минут с перерывом. Во время центрифугирования готовили магнитный стенд и закрепляли LS-колонки (каждая не более чем для 1×10^8 клеток), под каждой колонкой поместили пустую центрифужную пробирку на 15 мл. Колонки промывали трижды по 3 мл MACS-буфера. Клеточный осадок после центрифугирования ресуспендировали в 1 мл охлажденного MACS-буфера и заливали в колонку. Далее трижды промывали содержимое колонки порциями по 3 мл MACS-буфера. Колонки сняли со стенда и поместили над новыми пробирками на 15 мл. CD14+ моноциты вымывали из колонки 10 мл MACS-буфера. Производили подсчет клеток и центрифугировали при 420 gcf в течение 10 минут. Полученная клеточная популяция содержала 95-98% моноцитов, что контролировалось при помощи анализа поверхностной экспрессии маркера моноцитов CD14 проточной цитометрией.

Моноциты культивировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в клеточной среде X-VIVO. Клетки инкубировали при температуре 37°C и 7,5% CO_2 в течение 6 суток.

Результаты. В данной работе представлена отработанная методика выделения моноцитов из периферической крови методом магнитной сепарации, которая, по данным Грачева и др. [1], обеспечивает наиболее высокую чистоту клеточной популяции (95-99%). Количество полученных клеток при работе с лейкостромбослом составило 40-70 млн, чего было достаточно для проведения

функциональных тестов *in vitro* (цитотоксического теста, теста стимуляции ангиогенеза, теста стимуляции пролиферации и др.), системы поляризации моноцитов в макрофаги про- либо противовоспалительного типа с помощью специфических стимулов (цитокинов, дексаметазона). Выделение клеток из лейкотромбослоя позволяет получить больший выход моноцитов, однако, согласно опубликованным ранее данным, многоэтапность выделения клеток увеличивает потери моноцитов [2]. С целью минимизации потерь клеток в процессе их выделения нами была опробована методика позитивной магнитной сепарации моноцитов из цельной крови, призванная снизить потери клеток на этапе, предшествующем сепарации. В результате была получена клеточная фракция с чистотой 88-92% и количеством, достаточным для проведения исследований культуры моноцитов/макрофагов *in vitro*.

В работе были также подобраны оптимальные условия для жизнеспособности и формирования специфических субтипов макрофагов: концентрации цитокинов: IL-4 (10 нг/мл), IFNgamma (100 нг/мл), TGFbeta (5 нг/мл), IL-10 (2 нг/мл), M-CSF (5 нг/мл) и концентрация дексаметазона 10^{-8} М.

Закключение. Исследованная нами методика не является безальтернативной. Применение находят и другие способы выделения моноцитов из лейкоцитарной фракции [3, 4]. В наших исследованиях была выбрана магнитная сепарация, поскольку на данном этапе развития методов выделения она показывает наилучшие результаты [1]. На основе проведенных экспериментальных исследований освоена методика выделения моноцитов из периферической крови человека при помощи магнитной сортировки (MACS) с использованием CD14-позитивной селекции. Было также протестировано действие цитокинов IL-4, IFNgamma, TGFbeta, IL-10 и различных концентраций M-CSF на жизнеспособность макрофагов в культуре в течение 6 суток.

Данное научное исследование выполнено при финансовой поддержке научного фонда имени Д.И. Менделеева.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грачев А.Н. Выделение моноцитов из крови человека для изучения влияния факторов внешней среды на иммунитет [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://inat.ru/publications/2009-2012/vydelenie-monotsitov-iz-krovi-cheloveka-dlya-izucheniya-vliyaniya-faktorov-vneshnej-sredy-na-immunitet>. – 24.02.17.
2. Никифоров Н.Г. Тест-система для изучения влияния фармакологических агентов на активацию моноцитов крови человека // Современный мир, природа и человек. – 2011. – Т. 2, № 1. – С. 108-110.
3. Иммунология. Практикум: учебное пособие / Под ред. Л.В. Ковальчука, Г.А. Игнатьевой, Л.В. Ганковской. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 194 с.
4. Menck. K. Isolation of Human Monocytes by Double Gradient Centrifugation and Their Differentiation to Macrophages in Teflon-coated Cell Culture Bags [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.jove.com/video/51554/-?language=Russian>. – 27.02.17.

**ЭКСПРЕССИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ
МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ**

А.А. Щеголева, Т.С. Геращенко, Л.А. Таширева

Научные руководители: к.б.н. Е.В. Денисов

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

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

E-mail: shegolmay@gmail.com

**EXPRESSION FEATURES OF DIFFERENT VARIANTS OF MORPHOLOGICAL
CHANGES IN THE BRONCHIAL EPITHELIUM**

A.A. Shchegoleva, T.S. Gerashchenko, L.A. Tashireva

Scientific Supervisors: E.V. Denisov, PhD

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

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

E-mail: shegolmay@gmail.com

Abstract. *In this study, we analyzed the expression profiles of various changes in the bronchial epithelium (basal cell hyperplasia and squamous metaplasia in different combinations). As a result, the expression profiles of basal cell hyperplasia depended on the presence/absence of squamous metaplasia in this bronchus. Similarly, the profile of squamous metaplasia was also determined by the presence/absence of basal cell hyperplasia or dysplasia.*

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]. В предыдущих исследованиях нами было показано, что в зависимости от сочетания друг с другом реактивные изменения эпителия бронхов (БКГ и ПМ) характеризуются специфической экспрессией белков p53, Ki-67, Bcl-2 и CD138 [2]. Кроме того, наличие изолированной БКГ в мелких бронхах больных с НМРЛ было связано с высокой частотой гематогенного метастазирования [3], а сочетание БКГ и ПМ – с повышенной вероятностью рецидивирования заболевания [2]. В данном исследовании мы предположили, что разные варианты БКГ и ПМ демонстрируют специфический характер экспрессии генов.

Материалы и методы. В исследовании использовались образцы бронхов, отдаленные от опухолевого очага больных НМРЛ и содержащие различные варианты морфологических изменений бронхиального эпителия: изолированная БКГ (иБКГ; БКГ+ПМ–; n=2), БКГ, сочетающаяся с ПМ (пмБКГ; БКГ+ПМ+; n=2), ПМ, сочетающаяся с БКГ (бкгПМ; БКГ+ПМ+; n=2) и ПМ, сочетающаяся с дисплазией (дПМ; БКГ–ПМ+Д+; n=1). С помощью лазерной микродиссекции (PALM, Carl Zeiss, Германия) из гематоксилин и эозин окрашенных срезов (толщина 5 мкм) были получены образцы

иБКГ, пмБКГ, бкгПМ, дПМ, и нормального бронхиального эпителия. Микродиссектированные образцы использовались для выделения РНК (RNeasy Plus Micro Kit, Qiagen, США) и последующего проведения полнотранскриптомной амплификации (Ovation PicoSL WTA System V2 kit, Nugen, США). Образцы кДНК метились флюоресцентным красителем Cy3 (SureTag DNA labeling kit, Agilent Technologies, Inc., США) и гибридизовались на микроматрицах SurePrint G3 Human GE v2, 8x60K (Agilent Technologies, Inc., США). Полученные данные подвергали обработке в среде R (R Development Core Team, 2008) с помощью программного пакета limma [4]. Функциональное аннотирование проводили с помощью онлайн инструмента GO Enrichment Analysis [5].

Результаты. Кластерный анализ показал, что БКГ и ПМ в значительной степени отличались от нормального эпителия, а также друг от друга. Тем не менее, варианты БКГ были более схожи друг с другом, чем с ПМ. Более того, бкгПМ по экспрессионному профилю была ближе к кластеру иБКГ+пмБКГ, чем к дПМ (рис. 1. А).

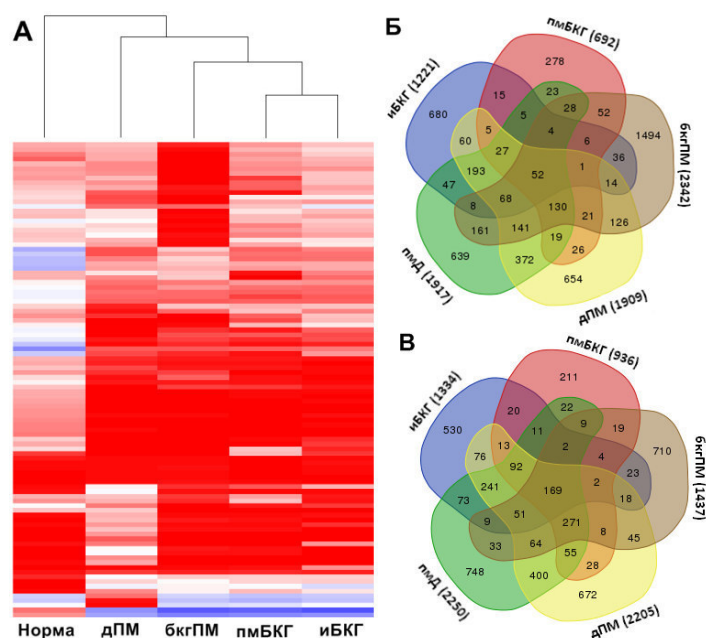


Рис. 1. Тепловая карта уровня экспрессии генов (ТОП 100) в морфологических изменениях эпителия мелких бронхов, отдаленных от НМРЛ, и кластерный анализ их экспрессионной близости друг к другу (А). Количество общих и специфических гипер- (Б) и гипозэкспрессирующихся (В) генов в различных вариантах морфологических изменений бронхиального эпителия.

В иБКГ обнаружена гиперэкспрессия 1221 и гипозэкспрессия 1334 генов. Специфическая гиперэкспрессия, свойственная этому варианту БКГ, была характерна для 680, а гипозэкспрессия – для 530 генов (рис. 1. Б,В). Функциональное аннотирование гиперэкспрессирующихся генов показало отсутствие связи иБКГ с какими-либо биологическими процессами, однако анализ сигнальных путей показал значимую регуляцию в иБКГ метаболизма ретинола, ксенобиотиков через систему цитохромов 450 и химического канцерогенеза. При анализе гипозэкспрессирующихся генов была показана связь иБКГ с разнообразными процессами и сигнальными путями, большинство из которых ассоциированы с иммунным ответом.

При пмБКГ обнаружены 692 гипер- и 936 гипоекспрессирующихся генов, из них 278 и 211, соответственно, были специфическими (рис. 1. Б,В). Экспрессия гиперэкспрессирующихся генов не была статистически значимо связана как с какими-либо процессами, так и с сигнальными путями. Анализ гипоекспрессирующихся генов показал связь с регуляцией процессов и путей, участвующих в организации внеклеточного матрикса, продукции молекул адгезии и клеточной пролиферации.

При бкгПМ резко увеличилось число гиперэкспрессирующихся генов – до 2342, а гипоекспрессирующихся генов – до 1437, из них 1494 и 710, соответственно, были специфическими (рис. 1. Б,В). Данный вариант ПМ характеризовался гиперэкспрессией генов, вовлеченных в G-белок-связанный и ольфакторный сигнальные пути. Помимо этого гипоекспрессирующиеся гены были ассоциированы с контролем различных процессов: репарации ДНК, клеточного цикла, роста и старения, метаболизма и т.д.

При дПМ наблюдалась гиперэкспрессия 1909 и гипоекспрессия 2205 генов, из них 654 и 672 – специфические, соответственно (рис. 1. Б,В). Экспрессия гиперэкспрессирующихся генов в дПМ была ассоциирована с процессами клеточного цикла, ответом на ксенобиотики и развитием эпителия. Аннотирование гипоекспрессирующихся генов показало значительную связь с процессом сборки реснитчатого эпителия и аксономы, организацией внеклеточного матрикса, миграцией и хемотаксисом лейкоцитов, регуляцией клеточной пролиферации и дифференцировки пневмоцитов II-го типа.

Заключение. Экспрессионный профиль БКГ зависел от того, сочетается она с ПМ или нет. Аналогичным образом профиль ПМ также определялся наличием БКГ или дисплазии. Различия каждого из вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия отмечались на уровне количества дифференциально гипер- или гипоекспрессирующихся генов и регуляции биологических процессов и сигнальным путей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kadara H., Wistuba I.I. (2014) Molecular Biology of Lung Preneoplasia. Lung Cancer, Ch. 6, pp. 110-128.
2. 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.
3. 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; Оpubл. 10.08.2013, Бюл. № 22.
4. Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K.. (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Res, Vol. 43, no. 7, pp. Es.47.
5. Gene Ontology Consortium (2015) Gene Ontology Consortium: going forward. Nucleic Acids Res, Vol. 43, pp. D1049-56.

Научное издание

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

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

Издано в авторской редакции

Компьютерная верстка С.А. Поробова
Редактор Г.А. Воронова, И.А. Курзина

Тираж 100 экз.



Национальный исследовательский
Томский политехнический университет
Система менеджмента качества
Издательства Томского политехнического
университета сертифицирована в соответствии с
требованиями ISO 9001:2008
. 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30
Тел./факс: 8(3822)56-35-35, www.tpu.ru

