МЕДИЦИНСКИЙ АКАДЕМИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОФИЦИАЛЬНОЕ ИЗДАНИЕ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ОТДЕЛЕНИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

ТОМ 16
2016 № 4

ISSN 1608-4101

СЕВЕРО-ЗАПАДНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАМН

Фортелизин®
Опережая время,
сохраняем жизнь
5 мг
Фортелизин®
Супраген

ISSN 1608-4101

МЕДИЦИНСКИЙ АКАДЕМИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№ 4 ТОМ 16 2016

ОФИЦИАЛЬНОЕ ИЗДАНИЕ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ОТДЕЛЕНИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Северо-Западное отделение медицинских наук
Институт экспериментальной медицины
Балтийский медицинский образовательный центр

Главный редактор:
академик РАН *Г. А. Софронов*

Заместитель главного редактора:
академик РАН *Н. А. Беляков*

Ответственный секретарь:
доктор биологических наук профессор РАН
А. В. Дмитриев

СЕВЕРО-ЗАПАДНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАМН

Журнал рекомендован ВАК для публикации материалов диссертаций

Адрес: 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71,
Северо-Западное отделение Российской академии наук,
Редколлегия журнала «Медицинский академический журнал»
Тел.: (812) 234-68-57

e-mail: medicalacademicjournal@gmail.com

Журнал зарегистрирован Территориальным управлением по Санкт-Петербургу и Ленинградской области Министерства РФ по делам печати, телевидения и средств массовой коммуникации.
Свидетельство о регистрации ПИ № 2-4952 от 17.01.2001 г.

Редакционная коллегия

Э. К. Айламазян — академик РАН, Санкт-Петербург
С. Ф. Багненко — академик РАН, Санкт-Петербург
В. Б. Васильев — профессор, Санкт-Петербург
В. Р. Вебер — академик РАН, Великий Новгород
И. П. Дуданов — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
С. А. Кетлинский — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
Ю. В. Лобзин — академик РАН, Санкт-Петербург
В. И. Мазуров — академик РАН, Санкт-Петербург
Н. А. Майстренко — академик РАН, Санкт-Петербург
А. О. Марьяндышев — член-корреспондент РАН, Архангельск
А. С. Симбирцев — профессор, Санкт-Петербург
А. Г. Софронов — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
А. Н. Суворов — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
А. А. Тотолян — академик РАН, Санкт-Петербург
Т. Н. Трофимова — профессор, Санкт-Петербург
Е. В. Шайдаков — профессор, Санкт-Петербург

Редакционный совет

А. Г. Баиндурашвили — академик РАН, Санкт-Петербург
В. С. Баранов — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
Б. В. Гайдар — академик РАН, Санкт-Петербург
А. М. Гранов — академик РАН, Санкт-Петербург
А. Я. Гриненко — академик РАН, Санкт-Петербург
Е. А. Корнева — академик РАН, Санкт-Петербург
С. В. Лобзин — профессор, Санкт-Петербург
В. А. Медик — член-корреспондент РАН, Великий Новгород
М. М. Одинак — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
Л. В. Поташов — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
Н. С. Сапронов — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
А. А. Скоромец — академик РАН, Санкт-Петербург
П. И. Сидоров — академик РАН, Архангельск
С. А. Симбирцев — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
Р. М. Тихилов — профессор, Санкт-Петербург
П. Д. Шабанов — профессор, Санкт-Петербург
А. В. Шабров — академик РАН, Санкт-Петербург
Е. В. Шляхто — академик РАН, Санкт-Петербург
В. Х. Хавинсон — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
Н. А. Яицкий — академик РАН, Санкт-Петербург
Ю. К. Янов — академик РАН, Санкт-Петербург

ISSN 1608-4101

MEDICAL ACADEMIC JOURNAL

№ 4 Vol. 16 2016

THE OFFICIAL PUBLICATION OF THE NORTH-WEST BRANCH OF MEDICAL SCIENCES
SCIENTIFIC AND PRACTICAL PEER-REVIEWED JOURNAL

North-West Branch of Medical Sciences
Institute of Experimental Medicine
Baltic Medical Educational Center

Editor in Chief:
G. A. Sofronov
Full Member of the Russian Academy of Sciences

Deputy Editor in Chief:
N. A. Belyakov
Full Member of the Russian Academy of Sciences

Executive Secretary:
A. V. Dmitriev
Doctor of Biological Sciences
professor of the Russian Academy of Sciences

Address: 197022, St. Petersburg, Kamennoostrovskiy, 71,
North-West Branch of the Russian Academy of Sciences,
Editorial board «Medical academic journal»
Tel.: (812) 234-68-57

e-mail: medicalacademicjournal@gmail.com

Editorial Board

E. K. Ailamazian, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
S. F. Bagnenko, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
V. B. Vasiliev, professor, St. Petersburg
V. R. Veber, full member of the Russian Academy of Sciences, Velikiy Novgorod
I. P. Dudanov, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
S. A. Ketlinskiy, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
Yu. V. Lobzin, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
V. I. Mazurov, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
N. A. Maistrenko, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
A. O. Maryandyshev, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
A. S. Simbirtsev, professor, St. Petersburg
A. G. Sofronov, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
A. N. Suvorov, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
A. A. Totolyan, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
T. N. Trofimova, professor, St. Petersburg
Ye. V. Shaidakov, professor, St. Petersburg

Editorial Council

A. G. Baindurashvili — full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
V. S. Baranov, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
B. V. Gaidar, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
A. M. Granov, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
A. Ya. Grinenko, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
Ye. A. Korneva, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
S. V. Lobzin, professor, St. Petersburg
V. A. Medic, corresponding member of the Russian Academy Sciences, Velikiy Novgorod
M. M. Odinak, corresponding member of the Russian Academy Sciences, St. Petersburg
L. V. Potashov, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
N. S. Sapronov, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
A. A. Skoromets, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
P. I. Sidorov, full member of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk
S. A. Simbirtsev, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
R. M. Tikhilov, professor, St. Petersburg
P. D. Shabanov, professor, St. Petersburg
A. V. Shabrov, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
Ye. V. Shlyakhto, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
V. H. Khavinson, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
N. A. Yaitsky, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
Yu. K. Yanov, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЩАЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ В КЛИНИКЕ И В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОМАТОСЕНСОРНЫХ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ У ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ 11
А. И. Аксенова, В. Б. Войтенков, А. В Климкин, Н. В. Скрипченко, А. П. Герасимов

ОЦЕНКА МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У МЛАДШИХ ШКОЛЬНИКОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРОБЫ С ДОЗИРОВАННОЙ МЫШЕЧНОЙ НАГРУЗКОЙ 12
Н. В. Бабошина

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ КОРТИКОЛИБЕРИНА В МОЗГЕ КРЫС В «СКРЫТЫЙ» ПЕРИОД РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПТСР И ЕГО КОРРЕКЦИИ 13
К. А. Баранова, Е. А. Рыбникова

ВЛИЯНИЕ 1-ДЕЗАМИНО-8-D-АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА НА РАЗВИТИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ВИТАЛЬНЫМ СТРЕССОМ, У КРЫС 14
Г. В. Безнин, С. Г. Белокоскова, С. Г. Цикунов

ОЦЕНКА ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКОГО ВУЗА 15
Р. М.Бердиев, В. А.Кирюшин

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ МОЛИКСАН И ГЕПТРАЛ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ СОЛЯНОКИСЛЫМ ГИДРАЗИНОМ 16
П. А. Бугаев

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОЛИКСАНА ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ДЛИТЕЛЬНЫМ УПОТРЕБЛЕНИЕМ ИЗОНИАЗИДА, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ 17
П. А. Бугаев

АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПАЦИЕНТОВ ЧЕРЕЗ 4–8 ЛЕТ ПОСЛЕ БАРИАТРИЧЕСКИХ ОПЕРАТИВНЫХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ 18
Е. В. Васильев, Д. А. Вологжанин, Д. В. Гладышев, Н. С. Ильинский, В. В. Салухов, Е. Г. Слесарева, М. Б. Фишман, С. Г. Щербак

НАРУШЕНИЯ СНА И КАЧЕСТВО ЖИЗНИ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ БАРИАТРИЧЕСКИЕ ОПЕРАТИВНЫЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВА 20
Е. В.Васильев, Д. А.Вологжанин, Д. В.Гладышев, Н. С.Ильинский, В. В.Салухов, Е. Г.Слесарева, М. Б.Фишман, С. Г.Щербак

НОВЫЙ НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА С ПОМОЩЬЮ ЗВУКА 21
А. С. Гекалюк, М. В. Уланова, В. И. Разубаева, В. А. Федорова, А. А. Широков, О. В. Семячкина-Глушковская

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА: ДИАБЕТИЧЕСКАЯ СТОПА 22
М. А. Горячева, М. А. Ковалева, Я. А. Гущин, М. Н. Макарова

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ КОФЕРМЕНТА Q10 В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА КРЫС 23
А. В. Калатанова, И. Е. Макаренко, Я. А. Гущин, Н. М. Фаустова

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА ВЕНТИЛЯТОРНЫЙ ОТВЕТ ПРИ ГИПЕРКАПНИИ 24
А. А. Клинникова, Г. А. Данилова

МОНОАМИНЫ В ГИППОКАМПЕ, ГИПОТАЛАМУСЕ И СТРИАТУМЕ КРЫС ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ И ПСИХОГЕННОМ СТРЕССЕ 25
Д. В. Крицкая, М. Н. Карпенко, С. Г. Цикунов

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОВОЛОКОННЫХ БИОИМПЛАНТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ АХИЛЛОВА СУХОЖИЛИЯ 26
М. В. Кузьмин, И. С. Фадеева, Д. П. Горбачёв, Т. А. Аббасов, А. С.Сенотов, Р. С. Фадеев, Н. И. Фесенко, А. А. Ольхов, В. В. Гурьев, В. С. Акатов

РИСК РАЗВИТИЯ ТРОМБОТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИПОТЕРМИИ У КРЫС 27
Н. А. Лычева, И. И. Шахматов, А. В. Седов, И. И. Ковалева

СОСТОЯНИЕ МЕТАБОЛИЗМА NO В КРОВИ ДЕТЕЙ С ПАТОЛОГИЕЙ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ . . .28
А. К. Мартусевич, К. В. Киреева, О. В. Шумилова, Э. Н. Федулова

ВЛИЯНИЕ ИЗОЛИРОВАННОГО И СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕКСИДОЛА И ГИПОКСИИ НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА У КРЫС В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ . . .29
С. В. Москаленко

ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С ЭССЕНЦИАЛЬНЫМ ТРЕМОРОМ 31
З. М. Муружева, Е. А. Скоморохова, М. Н. Карпенко

ПРИЗНАКИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ У КРЫС С МАРГАНЦЕВОЙ ТОКСИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ 32
И. С. Обламская, Н. С. Пестерева, Е. А. Скомарохова, М. Н. Карпенко

ОРЕКСИН А В НЕЙРОНАХ ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ АНТИГЕНОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ 33
В. А. Пугач

РАЗРАБОТКА ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ С ВЫСОКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ БИОИНТЕГРАЦИИ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ 35
А. С. Сенотов, И. С. Фадеева, П. О. Кирсанова, Р. С. Фадеев, А. А. Просвирин, Н. И. Фесенко, М. В. Лекишвили, В. С. Акатов

ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОТОКА В МОДЕЛИ СИГМОВИДНОГО СИНУСА ЧЕЛОВЕКА 36
А. А. Тулупов, В. Н. Горев

ЛАТЕНТНЫЙ ПЕРИОД САККАДЫ И АНТИСАККАДЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАРАДИГМЕ «GO/NO GO DELAY» 37
А. А. Федотова, М. А. Чурикова, М. В. Славуцкая

ВНИМАНИЕ: НЕЙРОПСИХОЛОГИЧЕСКИЕ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАТТЕРНЫ 38
Ф. А. Хазипова, С. И. Низамутдинов, Л. З. Рашитов

ХРОНИЧЕСКОЕ ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1В В РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ПРИВОДИТ К ОТДАЛЕННЫМ НАРУШЕНИЯМ РАБОЧЕЙ ПАМЯТИ КРЫС 39
А. П. Шварц, А. Ю. Ротов, О. И. Чуприна, А. Н. Трофимов, Ищенко А. М., О. Е. Зубарева, В. М. Клименко

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ И МИКРОКАПИЛЛЯРОВ СЕРДЦА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕКСИКОРА У КРЫС С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ 40
А. В. Шумилова, А. В. Дерюгина

ГЕПАТОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОТ ФТОРИСТОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ОРГАНИЗМА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ) 41
Т. К. Ядыкина, Н. Н. Михайлова, А. Г. Жукова, Л. Г. Горохова, М. С. Бугаева

БИОМЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ, БИОФИЗИКА,ГЕНЕТИКА

МЕЖВИДОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ДО И ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ 1,3,4-ТИАДИАЗИНА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* 43
Н. Ж. Алисултанова, Н. А. Вахнина, В. Д. Шадрина, Е. Р.Бойко, Л. П. Сидорова, О. Н. Чупахин

ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ СЕМЕЙСТВА VSX В ХОДЕ РЕТИНОГЕНЕЗА У КУР 44
И. Н. Андрейченко, Р. Д. Зиновьева

СТЕХИОМЕТРИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОНГО КРАСНОГО С ФИБРИЛЛАМИ МОДЕЛЬНЫХ АМИЛОИДОГЕННЫХ БЕЛКОВ 45
О. И. Антимонова, Д. С. Поляков, Н. А. Грудинина, М. М. Шавловский

МИКРОВЯЗКОСТЬ И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ И ИЗЛУЧЕНИЯ ГАЗОРАЗРЯДНОЙ ПЛАЗМЫ 46
Е. В. Архипова, И. П. Иванова

ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСА RS1049970 ГЕНА VE-КАДГЕРИНА И УРОВЕНЬ ЕГО БЕЛКОВОГО ПРОДУКТА В КРОВИ ПРИ ТЯЖЕЛОМ ОСЛОЖНЕННОМ ТЕЧЕНИИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ 47
А. А. Байгильдина, О. А. Казамирова
СОДЕРЖАНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА У НОСИТЕЛЕЙ РАЗНЫХ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПО ПОЛИМОРФНЫМ МАРКЕРАМ ГЕНА NOS2 48
О. В. Балан, Л. В. Топчиева, И. Е. Малышева, В. А. Корнева, К. А. Панкрашова
ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЦИНКА НА ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ЛИПИДНЫХ РАФТОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* 50
Ю. М. Гармаза
КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПОЛНОГЕНОМНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ CCGG САЙТОВ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНОГО ТИПА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ БИСФЕНОЛОМ А 51
Н. И. Дергачева, И. О. Сучкова, Л. К. Сасина
ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ENDOG И КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ В НОРМЕ И ПРИ АПОПТОЗЕ 52
Д. Д. Жданов, Д. А. Васина, В. С. Орлова, М. В. Покровская, С. С. Александрова , Н. Н. Соколов
ВЫБОР ПРОМОТОРА ДЛЯ АСТРОЦИТСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В ГОЛОВНОЙ МОЗГ КРЫСЫ IN VIVO МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ .53
С. Н. Зобова, Д. А. Молотков, Л. С. Хируг
АНТИОКСИДАНТНЫЕ И ЦИТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА РЯДА АНАЛОГОВ ЭСТРОГЕНОВ *IN VITRO* ..54
И. И.Зорина, О. В. Галкина, Н. Д. Ещенко
ЭКТОПИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО В КРОВОТОКЕ КРЫС С ХРОНИЧЕСКИМ ДЕФИЦИТОМ ПЕЧЕНОЧНОГО ХОЛОЦЕРУЛОПЛАЗМИНА 56
Е. Ю. Ильичева, Л. А. Канаш, Н. А. Рожкова, З. Р. Тимирова
МЕТОД ОЦЕНКИ СИЛ АДГЕЗИИ В СИСТЕМЕ «МОДЕЛЬ ПРОКАРИОЦИТА – ЭУКАРИОЦИТ» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ 57
И. В. Конышев, В. Л. Кононенко, А. А. Бывалов
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАКТОРА, ИНГИБИРУЮЩЕГО МИГРАЦИЮ МАКРОФАГОВ, С ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ: РОЛЬ ЛАБИЛЬНЫХ ИОНОВ МЕДИ 58
В. А. Костевич, А. В. Соколов, Н. А. Грудинина, Е. Т. Захарова, В. Б. Васильев
РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА RS4537545 (C>T) ГЕНА IL6R В РАЗВИТИИ НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА 59
И. В. Курбатова, О. П. Дуданова, Л. В. Топчиева
ВОЗРАСТНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ КРИСТАЛЛОГЕННЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ДЕТЕЙ 61
А. К. Мартусевич, Л. М. Козлова, З. И. Прудникова, Л. К. Ковалёва
ХЛОРПРОМАЗИН ВЫЗЫВАЕТ CA^{2+}-ОТВЕТЫ В МАКРОФАГАХ 62
А. А. Наумова, З. И. Крутецкая, Л. С. Миленина, Н. И. Крутецкая, С. Н. Бутов
КОВАЛЕНТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БИОТИНОМ СМЫСЛОВОЙ ЦЕПИ ПЛАЗМИДЫ ДЛЯ ТРАНСФЕКЦИИ *IN VIVO* .63
Д. С. Поляков, А. Е. Ходова
АКТИВНОСТЬ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ GBA 65
К. А. Сенкевич, А. К. Емельянов, М. А. Николаев, А. Э. Копытова, И. Д. Семикова, М. В. Белецкая, Г. В. Байдакова, И. В. Милюхина, А. А. Тимофеева, А. Ф. Якимовский, Е. Ю. Захарова, С. Н. Пчелина
ЛОКАЛИЗАЦИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ДЛЯ РЕГУЛЯТОРНОГО РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА, ПОДАВЛЯЮЩЕГО АУТОИММУННЫЕ РЕАКЦИИ, НА FC ФРАГМЕНТАХ IGG ЧЕЛОВЕКА 66
А. Ю. Сидоров, М. П. Ирина, Е. Н. Клюева, А. С. Терентьев, И. В. Меньшиков
СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ГЕНА CCN2 НА МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ РАКЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 67
Д. В. Тюлькина
ВЛИЯНИЕ (22R,23R)-22,23-ДИГИДРОКСИ-5А-ХОЛЕСТ-2-ЕН-6-ОНА НА ER/ЦИКЛИН D1 МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПУТЬ В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ MCF-7 68
Т. И. Янова, Ю. В. Ермолович, А. Р. Мехтиев, О. С. Тимошенко, И. В. Федюшкина, О. Е. Андреева, А. М. Щербаков, А. В. Веселовский, В. Н. Жабинский

ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ МОРФОГЕНЕЗА В НОРМЕ, ПРИ ПАТОЛОГИИ И В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМАФФИННЫХ КЛЕТОК ОКОЛОСЕРДЕЧНОЙ ОБЛАСТИ НОВОРОЖДЕННОЙ КРЫСЫ 70
А. Л. Алексеенко, Е. И. Чумасов
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕЧЕНИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВОДОРАСТВОРИМОГО СОЕДИНЕНИЯ КРЕМНИЯ 71
Е. А. Григорьева
ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ТИМУСА МЫШИ 72
В. В. Гусельникова
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НЕЙРОНОВ ПЕРЕДНИХ РОГОВ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ В ЭМБРИОНАЛЬНОМ И РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ 73
Е. А. Колос
КОМПЕНСАТОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОЧКЕ, ОСТАВШЕЙСЯ ПОСЛЕ ОДНОСТОРОННЕЙ НЕФРЭКТОМИИ, ПРИ ВВЕДЕНИИ В ОРГАНИЗМ КОНЦЕНТРАТА ПОЛИФЕНОЛОВ ВИНОГРАДА 74
О. И. Лященко, А. А. Жукова, С. Н. Смирнова, Э. А. Джапеш
РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АСТРОЦИТОВ ПРИЛЕЖАЩЕГО ЯДРА ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ОГРАНИЧЕНИЯ КРОВОТОКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ 75
Н.Г.Наумов, А.В.Дробленков
СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЛИПОФУСЦИНА, ВЫЯВЛЯЕМОГО В МИОКАРДЕ ЧЕЛОВЕКА 76
И. М. Плешакова
КОМПЛЕКСНЫЙ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ФЕНОТИПА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭПИТЕЛИО-МЕЗЕНХИМНОГО ПЕРЕХОДА *IN VITRO* 77
А. А. Цитрина
EC-КЛЕТКИ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ ПРИ ГОЛОДАНИИ И РАЦИОНЕ С ИЗБЫТКОМ ЖИРОВ 78
М. Л. Чуркова, О. В. Иванова, С. В. Костюкевич, И. Е. Макаренко

КЛИНИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

ИНФЕКЦИОННЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ 80
А. Ф. Байбулатова, Б. А. Бакиров
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ 81
Д. С. Бомбоева, О. И. Иванова
АНТИБИОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *ESCHERICHIA COLI* СЕКРЕТА СЛЮННЫХ КЛЕТОК *HIRUDO MEDICINALIS* – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА, НЕ ВЫЗЫВАЮЩЕГО АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ 82
Гь Даньян, И. Б. Павлова
ВЫЯВЛЕНИЕ ХИТИНОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ *VIBRIO CHOLERAE* O1 И O139 В СУБСТРАТНОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ 83
С. Н. Козлов, Е. Ю. Марков, Л. Я. Урбанович, Э. Г. Гольдапель, Л. В. Миронова
ВЫЯВЛЕНИЕ НУКЛЕАЗ И ЛЕЦИТИНАЗ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ МЕТОДОМ СУБСТРАТНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ...85
С. Н. Козлов, Е. Ю. Марков, Л. Я. Урбанович
МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ИЗУЧЕНИЕ РАЗРУШЕНИЯ МАТРИКСА БИОПЛЕНКИ ПАРОДОНТАЛЬНОГО КАРМАНА 86
Н. Э.Колчанова, В. К.Окулич, В. Е.Шилин

МОРФОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ *IN VITRO* . .87
Е. В. Король
ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТ ШТАММОВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА 89
Н. А. Николаева, Г. Е. Брилль, А. В. Егорова
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ LBP НА АКТИВАЦИЮ КЛЕТОК КРОВИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМИ РАЗНОЙ СТРУКТУРЫ 90
Я. В. Радзюкевич, Д. А. Серов, И. Р. Прохоренко
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ *LACTOBACILLUS SPP.* ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ 91
Г. В. Рябинин
СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА В СРЕДЕ И СИСТЕМЫ *QUORUM SENSING* НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ SERRATIA PROTEAMACULANS 92
О. А. Цаплина
ЧАСТОТА РАСПРОСТРАНЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ СРЕДИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ СЕПСИСОМ 94
Е. А. Четвернина, О. С. Абрамовских, А. Ю. Савочкина, Л. Р. Торопова, И. В. Молчанова

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

ФАКТОРЫ РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ 1 И 2 ТИПА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ КОСТЕЙ 96
А. А. Алфёров, Е. А. Тен, С. С. Бабкин, А. И. Батырев
ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ ЛИПИДНОГО СПЕКТРА КРОВИ ПРИ ПСОРИАЗЕ И ПСОРИАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ 97
А. А. Барило, С. В. Смирнова, М. В. Смольникова
ГЕНОДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ В 2015 ГОДУ . . .99
А. А. Батурин, Г. А. Ткаченко, М. Л. Леденева, Л. В. Лемасова
СОСТОЯНИЕ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В СЛЮНЕ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО 100
Л. В. Бельская, В. К. Косенок
УРОВЕНЬ МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ В СЛЮНЕ ПРИ ОНКОПАТОЛОГИИ 101
Л. В. Бельская, В. К. Косенок
СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОВ У ДЕТЕЙ . .103
Е. А. Дементьева
СИСТЕМА ИНСУЛИНОПОДОБНЫХ ФАКТОРОВ РОСТА ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЯИЧНИКОВ 104
Э. Р. Исаева, Д. Н. Кушлинский, С. В. Мишков
СУБПОПУЛЯЦИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ CD4+CD25HI И CD4+CD25HICD127LOW/- TREG- ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ 105
П. Н. Кравченко, А. В. Чуров, Е. К. Олейник, Г. А. Жулай, В. М. Олейник, О. Ю. Барышева, И. М. Марусенко
МЕТОД МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ПО СОСТАВУ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА 106
А. Г. Кузьмин, Е. И. Ткаченко, Л. С. Орешко, Ю. А. Титов, А. С. Балабанов
КРИСТАЛЛОСКОПИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ, ОСУЩЕСТВЛЯЕМОЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АЗОТА 107
А. К. Мартусевич, А. В. Разумовский, Л. К. Ковалёва, А. А. Мартусевич
ПРОАНГИОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ 108
В. В. Муштенко, П. В. Глыбин, А. В. Колпаков, А. А. Морозов
ИНСУЛИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА (ИФР) И ИФР-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ 109
А. А. Николаев, Е. А. Короткова, О. И. Костылева
ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ SNAI1, SNAI2, NF-KB И РЕГУЛЯТОРЫ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 111
О. Г. Овсий, А. М. Щербаков, Е. И. Алексеева, Л. К. Овчинникова
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ ПТИЦ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ В СЭНДВИЧ-МЕТОДЕ ТЕСТИРОВАНИЯ HBS-АНТИГЕНА 112
А. А. Печелюлько, Ю. Н. Тараканова
РАЗЛИЧНЫЕ ПАРЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ВЫЯВЛЯЮТ РАЗНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАСТВОРИМОГО ЭНДОГЛИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА 113
И. В. Смирнов, И. В. Грязева, М. П. Самойлович, Л. А. Терехина, И. Ю. Крутецкая, О. А. Шашкова, В. Б. Климович
ВЛИЯНИЕ PH БУФЕРА НА АДСОРБЦИЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ТВЕРДОФАЗНОМ ИФА 114
Ю. Н. Тараканова, А. А. Печелюлько
СИСТЕМА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА В ОЦЕНКЕ ПРОГНОЗА ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ 115
Ю. С. Тимофеев, А. В. Бондарев, М. Ю. Щупак
ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДРЕНИРОВАНИЯ ПОЧКИ У БОЛЬНЫХ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ С ОБСТРУКТИВНЫМИ УРОПАТИЯМИ 116
А. И. Хотько, Н. Б. Захарова, Д. Н. Хотько, Э. Б. Попыхова
ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ПРОБОПОДГОТОВКИ НА РЕЗУЛЬТАТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В КРОВИ 117
К. А. Черемисина, К. С. Бабин, А. А. Пахомова, Е. Г. Степанова, Г. Е. Яковлева
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ИХ ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА 1 ТИПА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ 119
И. С. Черномаз, И. В. Бабкина, А. В. Бондарев, И. Н. Кузнецов
ХРОМОГРАНИН А В ДИАГНОСТИКЕ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА 120
Т. К. Чурикова, М. Г. Томс

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ПАТОЛОГИИ

СЕКРЕЦИЯ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ MMP-9 КЛЕТКАМИ ЭНДОМЕТРИЯ 122
Н. Е. Волгина, А. А. Садекова, В. С. Щипицына, А. М. Красный
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ПРОГРЕССИРУЮЩЕМ МАССИВНОМ ФИБРОЗЕ РАБОТНИКОВ УГОЛЬНЫХ ШАХТ 123
В. П. Волобаев, Е. Э. Калюжная
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ ГИАЛУРОНАНА В КЛОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ОПУХОЛИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ 124
Н. О. Дашенкова, А. А. Цитрина, А. С. Микаелян
ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ (CAT, SOD1, SOD2), И СКЕЛЕТНЫЙ ФЛЮОРОЗ РАБОТНИКОВ АЛЮМИНИЕВОЙ ПРОМЫШЛЕНОСТИ 126
Е. Э. Калюжная, В. П. Волобаев
НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВ У БОЛЬНЫХ ЭПИЛЕПСИЕЙ .127
Т. В. Капустина, Ж. И. Савинцева, М. В. Иванов, Л. В. Липатова
ЭКСПЕРССИЯ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В КЛЕТКАХ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВЫХ СУДОРОГ ЗАВИСИТ ОТ ИХ ДЛИТЕЛЬНОСТИ 128
А. А. Коваленко, С. В. Калеменев, А. П. Шварц, О. Е. Зубарева
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ НАРУШЕНИЯ СТЕРОИДОГЕНЕЗА И ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ, В ГЕНАХ ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ NR0B1 И NR5A1 129
А. С. Орехова, Н. Ю. Калинченко, А. Н. Тюльпаков, П. М. Рубцов
М-КАЛЬПАИН КАК ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ПРОТЕАЗА 131
Н. С. Пестерева, И. С. Обламская, М. Н. Карпенко

ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТА ОРЕКСИНА OX1R SB-408124 НА СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА И НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОЛОВЫХ КЛЕТКАХ САМЦОВ КРЫС .132
А. В. Семёнова, Г. П. Косякова
ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У БОЛЬНЫХ ЭПИЛЕПСИЕЙ И АССОЦИИРОВАННЫМИ НЕПСИХОТИЧЕСКИМИ ПСИХИЧЕСКИМИ РАССТРОЙСТВАМИ 133
Н. А. Сивакова, Л. В. Липатова, А. П. Коцюбинский
УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА ИШЕМИЗИРОВАННОГО МИОКАРДА 134
В. П. Смирнов, И. А. Панышева
РАЗЛИЧИЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФОРМ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КРЫСЫ ..135
В. Б. Соболев, О. В. Сальникова, Д. Н. Воронков
РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ МЕДИАЛЬНОГО АРКУАТНОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА ПРИ ГИПОГОНАДИЗМЕ У САМЦОВ КРЫС 136
А. В. Фёдоров, Ю. Н. Юхлина, А. В. Дробленков
ОБЩИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА 137
А. Г. Хотулёва
ВЛИЯНИЕ БИСФЕНОЛА А НА РАЗВИТИЕ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШЕЙ В ДВУХ ПОКОЛЕНИЯХ 139
В. Ч. Чан, Е. М. Нониашвили
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ МОЗГА: РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК И ГИСТОНА H3 140
А. В. Чурилова, М. О. Самойлов

ВИРУСОЛОГИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ И КОАГУЛЯЦИОННЫЙ ГЕМОСТАЗ ПРИ КОМОРБИДНОСТИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЁГКИХ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА. ЕСТЬ ЛИ СВЯЗЬ? 142
Э. А. Абдуганиева, И. В. Ливерко
МЕХАНИЗМЫ ИДИОТИПИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ АУТОИММУННОЙ РЕАКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ИММУНИЗАЦИЕЙ АЛЛОАНТИГЕНОМ. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 143
Н. Н. Абишева, И. В. Меньшиков
ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС СИНДРОМА (ОРДС), ВЫЗВАННОГО ВИРУСАМИ ГРИППА A/H1N1/PDM09 И A/H3N2 (A/AICHI/2/1968) 144
А. Г. Александров
ВЫЯВЛЕНИЕ IGM-АНТИТЕЛ К ПАРВОВИРУСУ B19 У БОЛЬНЫХ С ЭКЗАНТЕМНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НА ТЕРРИТОРИЯХ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА 145
А. Ю. Антипова, И. Н. Лаврентьева, М. А. Бичурина, Л. П. Сухобаевская, И. В. Хамитова
ОЦЕНКА ИНТЕГРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННЫМ ЭНДОКАРДИТОМ 146
И. И.Бадыков, А. В.Шестакова, А. П.Годовалов, Б. К.Кадыралиев
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА FLICVP6VP8 147
Е. Г. Богомолова, Е. А. Фёдорова, И. В. Духовлинов, А. С. Симбирцев
ИММУНИЗАЦИЯ ДОМАШНИХ УТОК ЖИВЫМ НЕПАТОГЕННЫМ ВИРУСОМ ГРИППА H5N3 ПРЕДОТВРАЩАЕТ ЦИРКУЛЯЦИЮ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА H5N1 148
Е. Ю.Боравлёва, И. В.Гордейчук, А. В.Луницын, А. С.Гамбарян
ЭНДОГЕННЫЙ МЕЛАТОНИН В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ TH17 ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ 150
Н. С. Глебездина, И. В. Некрасова, А. А. Олина, Е. М. Куклина
РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСА ГРИППА A(H1N1)PDM09 В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ 150
А. Д.Васильева, Д. М. Даниленко, Н. И. Коновалова, П. А. Петрова, М. Ю. Еропкин, А. И. Желтухина, Е. Г. Корнилова
ВЛИЯНИЕ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* НА БАКТЕРИЦИДНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ 152
А. С. Головин, Э. А. Старикова, И. С. Фрейдлин
АНАЛИЗ ЧАСТОТ МУТАЦИЙ В ГЕНОМЕ ВИЧ-1 СУБТИПА А В ОБЛАСТЯХ, СОДЕРЖАЩИХ ЭФФЕКТИВНЫЕ МИШЕНИ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ 153
М. А. Горбачева, И. Р. Алембеков, Д. М. Федосеева, Д. В. Сосин, О. В. Кретова, Н. А. Чуриков
АНТИГЕННЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСОВ ГРИППА В, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В РОССИИ В ПЕРИОД С 2014 ПО 2016 гг. 154
А. И. Желтухина, А. В. Фадеев, А. Б. Комиссаров, Т. Г. Лобова, Д. М.Даниленко, П. А. Петрова, Н. И. Коновалова, А. Д. Васильева, М. Ю. Еропкин
ВЛИЯНИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА, ЛАКТОФЕРРИНА И ИХ КОМПЛЕКСА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ 155
С. О. Козлов, Н. А. Грудинина, И. В. Кудрявцев, В. А. Костевич, А. В. Соколов
ХОЛОДОАДАПТИРОВАННЫЙ ВИРУС В/ЛЕНИНГРАД/14/17/55 — АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ДОНОР АТТЕНУАЦИИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ДЕТЕЙ МЛАДШЕГО ВОЗРАСТА 156
Е. В. Крутикова, И. В. Киселева, Е. А. Федорова, И. А. Дубровина, Е. А. Большунова, Л. Г. Руденко
РАСПРОСТРАНЕНИЕ И МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ СРЕДИ СОБАК В Г. АЛМАТЫ 157
Т. Кузнецова, Ж. Ж. Кумекбаева, Т. Алимова, Н. В. Абеленцева, Е. Э. Мейлем
ВЛИЯНИЕ СУПЕРНАТАНТОВ РАЗРУШЕННЫХ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* НА МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК 158
Д. Т. Маммедова, Э. А. Старикова, И. С. Фрейдлин
АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК 160
А. С. Мамонтов, П. Г. Назаров, Ю. А. Дешева, Л. Г. Руденко
МНОГОМЕРНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНИТЕТА С ВЫДЕЛЕНИЕМ РОЛИ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЛУЧЕВЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ЛЕГКИХ 161
Т. Ю. Мушкарина, Е. Г. Кузьмина
РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ГЛИКОКОНЪЮГАТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДНОГО АНТИГЕНА *S. PNEUMONIAE* И СТОЛБНЯЧНОГО АНАТОКСИНА ...162
Р. И. Нуриев, И. А. Гальвидис, Н. Е. Ястребова, М. А. Буркин
ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕННОЙ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ИЗОЛЯТОВ РСВ, ВЫДЕЛЕННЫХ В Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ 163
Е. Р. Петрова, А. В. Фадеев, И. В. Поляков, А. А. Егорова
ОСОБЕННОСТИ АНТИГЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВИРУСОВ ГРИППА А И В, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2015–2016 гг. 165
П. А. Петрова, Н. И. Коновалова, С. М. Щеканова, А. Д. Васильева, Т. Г. Лобова, А. И. Желтухина, М. Ю. Еропкин
МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТИМУСНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ 166
К. В. Рутто, И. В. Кудрявцев, Е. П. Киселева
ОЦЕНКА АНТИНЕЙРАМИНИДАЗНЫХ АНТИТЕЛ В КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЯХ ПРОТОТИПА ПАНДЕМИЧЕСКОЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПОДТИПА A(H7N9) 167
Т. А. Смолоногина, С. А. Донина, Ю. А. Дешева, Л. Г. Руденко
РОЛЬ НЕЙТРОФИЛОВ В ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ РЕГУЛЯТОРНОГО РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА, КОНТРОЛИРУЮЩЕГО АУТОРЕАКТИВНОСТЬ ..168
Е. Ю. Столярова, Л. В. Бедулева, К. М. Вахрушева, А. Р. Рамазанова
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ КРОСС-РЕАКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ ПРОТИВ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА РАЗНЫХ ПОДТИПОВ 169
И. А. Сычев, Т. А. Смолоногина, П. М. Копейкин, Ю. А. Дешева, Л. Г. Руденко

АНАЛИЗ РОСТОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВЕКТОРНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА 171
Т. С.Третяк, И. Н.Исакова-Сивак, Д. А.Кореньков, Т. А.Смолоногина, Л. Г.Руденко
ПРОСТРАНСТВЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ХИМЕРНЫХ МОЛЕКУЛ ГЕМАГГЛЮТИНИНА, СОДЕРЖАЩИХ ИММУНОГЕННЫЕ ЭПИТОПЫ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ В .172
Е. А. Федорова, И. Н. Исакова-Сивак, А. Н. Суворов, Д. А. Кореньков172
ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ, СОДЕРЖАЩИХ НУКЛЕОПРОТЕИН ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА 173
Э. А. Хайрушева, И. Н. Исакова-Сивак, Т. А. Смолоногина, Т. С. Третяк, Л. Г. Руденко

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ФАРМАКОЛОГИИ И ФАРМАЦИИ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ И ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЙ ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ХИМИОПЕРФУЗИИ В ЛЕЧЕНИИ РАКА ЯИЧНИКА 175
И. К. Альвовский, Г. В. Точильников, В. Г. Беспалов
ТРИЭТАНОЛАММОНИЕВАЯ СОЛЬ 1-ПРОПИЛИМИДАЗОЛ-4,5-ДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ: ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 176
М. А. Брусина, Д. Н. Николаев, В. С. Фундаменский, А. А. Золотарев, А. М. Потапкин, А. В. Селитреников, Ю. А. Зевацкий, С. М. Рамш, Л. Б. Пиотровский
ИЗУЧЕНИЕ НЕФРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ АЛЬФА-1 КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА НА МОДЕЛИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПОЧЕК 177
П. В. Буренков, И. Е. Макаренко, М. Н. Макарова
ОЦЕНКА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ КОМБИНАЦИИ ЭКСТРАКТОВ ТИМЬЯНА И ПЛЮЩА НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЛЕГКИХ У КРЫС . .178
Е. А. Вахромова, К. Л. Крышень, М. Н. Макарова
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НОВОГО ТРИПЕПТИДА НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРЫСАХ .180
Е. Г. Григорьева, Н. А. Купцов, В. О. Лимаренко, Н. Е. Тимофеев, Ш. Ш. Шихмагомедов
АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВОЙ ТЕРАПИИ ЭНДОГЕННЫХ ИНФЕКЦИЙ НИЖНЕГО ОТДЕЛА ПОЛОВЫХ ПУТЕЙ У КУРСАНТОВ ЖЕНСКОГО ПОЛА ВЫСШИХ ВОЕННО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ МО РФ 181
А. Ю. Гурджиева, А. А. Шмидт, С. В. Бескровный, А. М. Иванов, М. Т. Алиева
ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ РАДАХЛОРИНОМ И ФОТОДИТАЗИНОМ НЕ СОПРОВОЖДАЕТСЯ АПОПТОЗОМ ЛИМФОЦИТОВ В ЛИМФОУЗЛАХ 182
А. П. Дысин, М. С. Рогачёва, В. Ю. Кравцов, М. А. Протченков, Т. И. Кузьмина, К. В. Павелец
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСА ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОРСКИХ ЕЖЕЙ183
А. Е. Кательникова, В. В. Воробьева, К. Л. Крышень, В. Г. Макаров, А. Н. Шиков
ДЛИТЕЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ КРЫСАМ ПРОТАМИНА СУЛЬФАТА МЕНЯЕТ РЯД ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, НО НЕ ВЛИЯЕТ НА ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ГЛЮКОЗЕ И ИНСУЛЯРНУЮ ФУНКЦИЮ 185
А. А. Куликова, К. В. Деркач, А. П. Трашков, Н. А. Верлов, М. Р. Артеменко, А. О. Шпаков
МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ *IN VITRO* НЕКОТОРЫМИ АНТИОКСИДАНТАМИ 186
А. Г. Мирошниченко, В. Ю. Перфильев
ПРИМЕНЕНИЕ КЛОПРОСТЕНОЛА ПРИ ЗАДЕРЖАНИИ ЖЁЛТОГО ТЕЛА БЕРЕМЕННОСТИ В ПОСЛЕОТЕЛЬНЫЙ ПЕРИОД 187
Л. В. Набатова, Г. П. Косякова
АКТИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В КРОВИ КРЫС НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УРАТНОЙ НЕФРОПАТИИ 188
В. Ю. Перфильев, А. Ю. Жариков, Д. Ю. Лукьяненко, И. В. Лысенко

КЛИНИЧЕСКАЯ ПСИХОЛОГИЯ, СОЦИАЛЬНАЯ РАБОТА, ГУМАНИТАРНЫЕ ДИСЦИПЛИНЫ

ХРОНОМЕТРАЖНОЕ И ЭРГОНОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАБОТЫ ВРАЧА-ОСТЕОПАТА 190
Д. Е. Мохов, И. Г. Юшманов
ВЛИЯНИЕ ИРРАЦИОНАЛЬНЫХ УСТАНОВОК НА УРОВЕНЬ БАЛЛОВ ДЕПРЕССИИ ШКАЛЫ БЕКА У ПАЦИЕНТОВ С НЕЙРОПАТОЛОГИЕЙ 190
Э. А. Кадырова, Л. В. Селиванова, Н. М. Блинова
ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ, ОТЯГОЩАЮЩИЕ ТЕЧЕНИЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ ПРИ ОПИОИДНОЙ ЗАВИСИМОСТИ 191
И. В. Савкин, Е. В. Маркова
ПСИХОЛОГИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ 193
А. В. Смык, Е. В. Маркова
ВЛИЯНИЕ ИРРАЦИОНАЛЬНЫХ УСТАНОВОК НА УРОВЕНЬ БАЛЛОВ ТЕСТА ДЕПРЕССИИ БЕКА И УСПЕВАЕМОСТЬ СТУДЕНТОВ 193
Л. В. Селиванова, Э. А. Кадырова, Н. М. Блинова

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ НАУКИ – МЕДИЦИНЕ

ПРОВЕДЕНИЕ ТОЧНОЙ НОРМИРОВКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ПРИ РАБОТЕ С ИНДУЦИРОВАННЫМИ ПЛЮРИПОТЕНТНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ И ПОЛУЧЕННЫМИ ИЗ НИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ В НЕЙРАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ КЛЕТОЧНЫМИ ЛИНИЯМИ 195
А. С. Артюхов, Э. Б. Дашинимаев, В. Цветков, Е. А. Воротеляк
ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ ПРИ ЛЕЧЕНИИ СКАЛЬПИРОВАННЫХ РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ 197
М. С. Асадулаев, Р. Г. Стояновский, Е. В. Зиновьев, И. А. Комиссаров, Н. В.Смирнова, М. Б. Панеях, Б. А. Титов, С. Д. Денисов, А. В. Бердиков, В. П. Карушев, А. С. Шабунин, П. В. Попрядухин, Д. В. Костяков
N-АЦИЛДОФАМИНЫ ИНДУЦИРУЮТ АПОПТОЗ В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ PC12 ЧЕРЕЗ НЕКЛАССИЧЕСКИЙ КАННАБИНОИДНЫЙ РЕЦЕПТОР НЕ-CB1-НЕ-CB2 198
А. М. Ашба, М. Г. Акимов, Н. М. Грецкая, В. В. Безуглов
ВЛИЯНИЕ ТРЕХДНЕВНОГО ВВЕДЕНИЯ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА НА ЭКСПРЕССИЮ ФЕРМЕНТОВ СТЕРОИДОГЕНЕЗА И УРОВЕНЬ ТЕСТОСТЕРОНА У САМЦОВ КРЫС 200
А. А. Бахтюков, К. В. Деркач, А. О. Шпаков
ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ И ФЕТАЛЬНЫЙ ГЕМОГЛОБИНЫ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ . .201
Р. А. Бисалиева, Х-М. А. Магомедов
ПРОТЕАЗЫ *PURPUREOCILLUM LILACINUM* K1 С АРС-ПОДОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ 202
А. А. Бобровская, А. А. Осмоловский, А. В. Кураков
ГИПОКСИЯ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ APOA-1, ABCA1 И C3 В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА 204
А. М. Богомолова, В. С. Шавва, А. А. Никитин
УКОРОЧЕНИЕ ТЕЛОМЕР И ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК АПОПТОТИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ ENDOG ПРИВОДЯТ К ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ CD4+ Т КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА 205
Д. А. Васина, Д. Д. Жданов, В. С. Орлова, Н. Н. Соколов
СТРУКТУРА ПОСЛЕДСТВИЙ СОЧЕТАННЫХ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВЫХ ТРАВМ И ОСОБЕННОСТИ РОДОРАЗРЕШЕНИЯ 206
А. А. Волынкин, П. Н. Власов, В. А. Петрухин
АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ УЧАСТНИКОВ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА, ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА И ТРАНСФЕРРИНА, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА HBA1C 206
И. В. Войнова, В. А. Костевич, А. Ю. Власенко, А. В. Соколов, В. Б. Васильев
ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА, ПРЕДПОЛАГАЕМЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

В КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ КИСТ СПИННОГО МОЗГА 208
А. Д. Воронова, О. В. Степанова, А. В. Чадин, Г. К. Бирюкова, И. В. Решетов, В. П. Чехонин

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ГЕТЕРОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ СМЕСЯХ 209
Э. Б. Дашинимаев, А. С. Артюхов, Н. В. Мещерякова, Е. А. Воротеляк, А. В. Васильев

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ГОТОВЫХ БЛЮД НА ПИЩЕВОЙ ТЕРМОГЕНЕЗ 210
Н. П. Егоренкова

СОЧЕТАННОЕ ПРОТИВОМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ С ПРИМЕНЯЕМЫМИ В КЛИНИКЕ АНТИБИОТИКАМИ 211
М. С. Жаркова, Д. С. Орлов, О. В. Шамова

МЕХАНИЗМ RAB5-RAB7-КОНВЕРСИИ В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА ЭФР-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ 212
Р. С. Каменцева, В. В. Кошеверова, М. В. Харченко, Е. С. Корнилова

ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ ОСТЕОЗАМЕЩАЮЩИХ МАТЕРИАЛОВ С МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ДЛЯ ПЛАСТИКИ ДЕФЕКТОВ ПРИ КОСТНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ 213
Е. С. Касьянова, С. А. Александрова, М. С. Сердобинцев

ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУРАХ. РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-KB 214
М. И. Кобякова, Р. С. Фадеев, М. Е. Соловьёва, В. С. Акатов

ПРИМЕНЕНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЕЗНИ ГИРШПРУНГА .215
И. А. Комиссаров, Н. В. Смирнова, Р. Г. Стояновский, А. В. Бердиков, В. П. Карушев, С. С. Денисов

РАЗРАБОТКА, СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОЛИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ СЕМЕЙСТВА БАКТЕНЕЦИНОВ 216
П. М. Копейкин, Т. А. Лукьянова, Д. С. Орлов, Б. Л. Мильман, А. Ю. Артамонов, О. В. Шамова

ЗАВИСИМОСТЬ СУТОЧНОГО РИТМА ВНУТРИГЛАЗНОГО ДАВЛЕНИЯ МЫШЕЙ ОТ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПОДТИПОВ АЛЬФА-1-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ 218
Н. В. Корсакова, Т. А. Малышкина

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И МРТ-ИЗМЕНЕНИЯ У БОЛЬНЫХ С УЛЬТРАВЫСОКИМ РИСКОМ РАЗВИТИЯ ШИЗОФРЕНИИ В ОКУЛОМОТОРНОЙ ПАРАДИГМЕ «GO/NO GO» 219
А. В. Котенев, С. А. Карелин, А. Томышев, М. В. Славуцкая

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НОВОЙ МУТАЦИИ В ГЕНЕ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ KLF11, ВЫЗЫВАЮЩЕЙ ДИАБЕТ MODY 220
Т. С. Краснова, А. С. Орехова, Н. А. Зубкова, А. Н. Тюльпаков, П. М. Рубцов

РОЛЬ НЕЙРОКИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ И ФЕРМЕНТОВ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ТАБАЧНЫМ ДЫМОМ 221
Ю. Б. Лепейко, И. В. Дюйзен

СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ НЕОНАТАЛЬНОЙ ГОНАДЫ МЫШИ СОХРАНЯЮТ СПОСОБНОСТЬ К ОБРАЗОВАНИЮ СЕМЕННЫХ КАНАЛЬЦЕВ ПОСЛЕ КРАТКОВРЕМЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ 222
Е. А. Малолина

РОЛЬ D1-РЕЦЕПТОРОВ ДОФАМИНА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ПОМК В АРКУТНОМ ЯДРЕ ГИПОТАЛАМУСА ..223
А. Л.Михрина, Е. В.Михайлова

ИНГИБИРОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА ХОЛЕСТЕРИНА КАК ТАРГЕТНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ SHH-ОПОСРЕДОВАННЫХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ 224
Р. Э. Мурадимова, З. И. Абрамова

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СУЛЬФАКРИЛАТА И СПИРТА ЭТИЛОВОГО НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ НЕПАРАЗИТАРНОЙ КИСТЫ ПЕЧЕНИ 225
Л. Ф. Муфазалова, Н. А. Муфазалова, А. Д. Марон, К. В. Батракова, В. А. Шевчук, А. З. Султанова

ВЛИЯНИЕ СУТОЧНЫХ БИОРИТМОВ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГОМЕОСТАЗ ШКОЛЬНИКОВ 226
М. С. Нечаева, Е. С. Токарева, П. П. Архипенко, Я. В. Булгакова, Е. В. Дорохов

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, СИНТЕЗИРУЕМОЙ ШТАММОМ *GLUCONACETOBACTER HANSENII* 227
И. Ю. Петрухин, А. Г. Демченко, В. В. Каширин

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА НА ТЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В СИСТЕМЕ НИЖНЕЙ ПОЛОЙ ВЕНЫ 228
Ж. М. Пиханова

ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В ТКАНЯХ ГЛАЗНОЙ ПОВЕРХНОСТИ У КРОЛИКОВ ПОРОДЫ ШИНШИЛЛА С МОДЕЛЬЮ СИНДРОМА «СУХОГО ГЛАЗА» 229
В. Ю. Попов, В. В. Бржеский, Н. М. Калинина

ДИАГНОСТИКА БРУКСИЗМА С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОГРАММЫ «OSTEOVIZOR» 230
С. П. Рубникович, И. Н. Барадина, Д. М. Бородин

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ У ПАЦИЕНТОВ МУЖСКОГО И ЖЕНСКОГО ПОЛА ПРИ МИОКАРДИТЕ 232
А. Л. Рунов, Е. В. Курчакова, О. М. Моисеева, Л. Б. Митрофанова, М. С. Вонский

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА С КОМПЛЕКСОМ ЛАКТОФЕРРИНА И ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ 233
А. В. Соколов, А. Ю. Власенко, В. А. Костевич, Э. А. Старикова, Е. Т. Захарова, В. Б. Васильев

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПСИХОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ БЕРЕМЕННЫХ И НЕБЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ЖЕЛУДОЧКОВОЙ АРИТМИЕЙ ..234
Е. Ю. Сопилова

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА СТРЕПТОКОККА, МУТАНТНОГО ПО ГЕНУ М-БЕЛКА 235
М. А. Суворова, А. Н. Цапиева, Н. В. Дуплик, Т. А. Крамская, К. Б. Грабовская, Е. П. Киселёва, В. А. Черешнев, А. Н. Суворов

ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРОТИВ НАТИВНЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫЗЫВАЕТ У КРЫС WISTAR АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АОРТЫ И ВИСЦЕРАЛЬНОЕ ОЖИРЕНИЕ ..236
Д. Н. Сунцова, К. В. Фомина, Л. В. Бедулева, А. А. Конорюкова, М. А. Кузина, А. Ю. Сидоров

КОРРЕКЦИЯ ГИПОТАЛАМИЧЕСКОЙ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС С ДИАБЕТОМ 2-го ТИПА С ПОМОЩЬЮ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫХ ИНСУЛИНА И СЕРОТОНИНА 237
И. Б. Сухов, К. В. Деркач, О. В. Чистякова, В. М. Бондарева, А. О. Шпаков

ЭФФЕКТЫ СОМАТОТРОПИНА НА ПРОСПЕКТИВНЫЕ ПОТЕНЦИИ К РАЗВИТИЮ *IN VITRO* ООЦИТОВ *BOS TAURUS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА ...238
Д. Н. Татарская, Т. И. Кузьмина

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СЕРОТОНИНОВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ НА ПОВЕДЕНЧЕСКУЮ АСИММЕТРИЮ АМФИБИЙ 239
А. С. Трулёв, А. С. Ермаков, Е. Б. Малашичев

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ С БЕЛКОМ КОМПЛЕМЕНТА C1Q 241
Е. С. Умнякова, Т. С. Леонова, М. Н. Берлов, В. Н. Кокряков

ЖИВОЙ ЭКВИВАЛЕНТ КОЖИ СТИМУЛИРУЕТ РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОЛНОСЛОЙНЫХ КОЖНЫХ РАН 242
Э. С. Чермных, Е. В. Киселева, О. С. Роговая, Е. А. Воротеляк

ПОВРЕЖДАЮЩИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ У НОВОРОЖДЕННЫХ ВЫЗЫВАЮТ ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У ВЗРОСЛЫХ САМЦОВ КРЫС 243
А. С. Шарова, А. В. Протасова, И. П. Буткевич, В. А. Михайленко, Т. Н. Шимараева

ФИБРОБЛАСТЫ КОЖИ ЗАРОДЫШЕЙ И ИХ УЧАСТИЕ В РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНЫХ РАН И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ 244
О. Н. Шевелева, С. Г. Рамазанова, О. В. Паюшина, Н. Н. Буторина

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ АЦИЛИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ ПЕПТИДА 562–572 РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА 245
Е. А. Шпакова, В. Н. Сорокоумов, А. В. Акентьев, К. В. Деркач, А. О. Шпаков

СТИМУЛЯЦИЯ С-КОНЦЕВЫМИ ФРАГМЕНТАМИ С-ПЕПТИДА АКТИВНОСТИ ГЕТЕРОТРИМЕРНЫХ G-БЕЛКОВ, СУБСТРАТОВ КОКЛЮШНОГО ТОКСИНА 246
Е. А. Шпакова, К. В. Деркач, В. Н. Сорокоумов, А. О. Шпаков

ОБЩАЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ В КЛИНИКЕ И В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОМАТОСЕНСОРНЫХ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ У ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ

[2]А. И. Аксенова, [1]В. Б. Войтенков, [1]А. В Климкин, [1]Н. В. Скрипченко, [2]А. П. Герасимов

[1]Научно-исследовательский институт детских инфекций федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

[2]Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Россия

aksenova.nastya2014@yandex.ru

Объективное исследование соматосенсорной системы у детей отличается большой сложностью вследствие недостаточного контакта с пациентом и, иногда, неспособностью его объективно оценивать и выражать свои ощущения. В этих условиях важную роль играет исследование соматосенсорных вызванных потенциалов — ССВП.

Целью нашего исследования было исследование соматосенсорных вызванных потенциалов у здоровых детей в возрасте от 1 месяца до 17.

Материалы и методы. Проведено исследование, целью которого было изучение соматосенсорных вызванных потенциалов у здоровых детей различных возрастных групп. Обследовано 94 неврологически здоровых ребенка. Всем проводилось исследование ССВП на вспышку. Оценивались амплитуда корковых пиков, время центрального сенсорного проведения при исследовании с рук (*n. Medianus*) и ног (*n. Tibialis*), показатели сравнивались между группами детей до 1 года, 1–12 лет и 12–17 лет.

Результаты. У 5 детей в возрастной группе от 1 мес до 1 года (5 из 23 детей, 22% подгруппы) достоверных корковых пиков при стимуляции большеберцового нерва не было выявлено. Между группами детей до 1 года и двумя другими группами выявлены достоверные отличия по времени центрального сенсорного проведения. Амплитуда корковых пиков достоверно между группами не отличалась.

Типичные ССВП при стимуляции *n. Medianus* у 5-месячного мальчика представлены на рисунке. Таким образом, соматосенсорные вызванные потенциалы могут применяться для объективной оценки состояния соматосенсорных путей у детей в возрасте от 1 мес до 17 лет. Между параметрами ССВП у детей в возрасте до 1 года и детьми 1–12 лет и 12–17 лет имеются достоверные различия по показателю времени центрального сенсорного проведения. Выявленное сокращение с возрастом времени центрального сенсорного проведения и повышение амплитуд корковых пиков может отражать миелинизацию путей соматосенсорной чувствительности и улучшение межцентральной интеграции соматосенсорной коры.

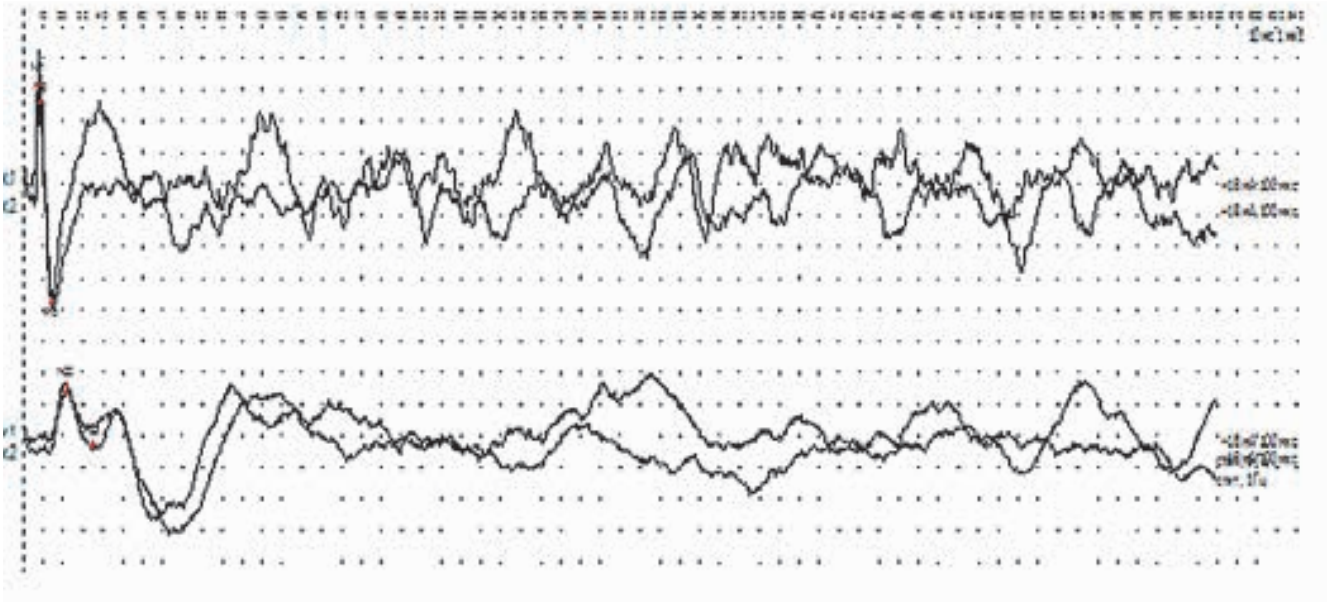


Рис. Соматосенсорные вызванные потенциалы при стимуляции *n. Medianus* у мальчика в возрасте 5 мес.

ОЦЕНКА МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У МЛАДШИХ ШКОЛЬНИКОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРОБЫ С ДОЗИРОВАННОЙ МЫШЕЧНОЙ НАГРУЗКОЙ

Н. В. Бабошина

Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского», Россия

pankrateva@bk.ru

Актуальность исследования. Особый интерес представляет изучение сердечно-сосудистой системы у детей при разных средовых воздействиях. В этой связи, изменениям системы микроциркуляции крови, дающим характеристику состояния тканевого кровотока и его изменчивости, придается существенное значение в условиях дозированной физической нагрузки.

Целью данной работы была оценка особенностей функционирования системы микроциркуляции у младших школьников под воздействием дозированной мышечной нагрузки.

Материалы и методы. В исследование были включены 59 детей обоего пола в возрасте 10 лет: 30 девочек и 29 мальчиков, после получения письменного информированного согласия их законных представителей (родителей). В качестве физической нагрузки дети выполняли 10 приседаний. С помощью метода лазерной допплеровской флоуметрии оценивали показатели микроциркуляции и ее регуляторные механизмы.

Показатели микроциркуляции регистрировали с использованием лазерного анализатора капиллярного кровотока ЛАКК-02 (НПП «ЛАЗМА», Москва). Обследование проводили в изолированном помещении при температуре 19–21° С, в положении обследуемого сидя, кисть ниже уровня сердца. В течение всех этапов исследования зонд флоуметра фиксировали на коже дистальной фаланги II пальца кисти правой руки.

На первом этапе оценивали: уровень перфузии (ПМ), среднеквадратичное отклонение (σ), коэффициент вариации (Kv), а также параметры микрососудистого тонуса: нейрогенный тонус (НТ), миогенный тонус (МТ), показатель шунтирования (ПШ). Расчетные параметры М (среднеарифметическое значение ПМ), σ и Kv дают общую оценку состояния микроциркуляции крови [1].

Более детальный анализ функционирования микроциркуляторного русла может быть представлен на втором этапе обработки ЛДФ-грамм базального кровотока при исследовании структуры ритмов колебаний перфузии крови. Среди звеньев регуляции микрокровотока выделяют «пассивные» и «активные» механизмы, которые в полосе частот от 0,005 до 3 Гц формируют пять неперекрывающихся частотных диапазонов: 0,007–0,017 Гц — диапазон эндотелиальной активности; 0,023–0,046 Гц — диапазон нейрогенной (симпатической адренергической) активности; 0,05–0,145 Гц — диапазон миогенной (гладкомышечной) активности; 0,2–0,4 Гц — диапазон респираторного ритма; 0,8–1,6 Гц —диапазон кардиального ритма [2].

Результаты и обсуждение. После дозированной нагрузки в группе мальчиков достоверных различий в показателях перфузии обнаружено. В группе девочек показатель микроциркуляции также достоверно не изменился. Вариабельность микрокровотока, отражающая напряженность функционирования регуляторных систем микрососудистого русла, в обеих группах увеличилась на 27% ($p<0,05$); в группе девочек и мальчиков среднеквадратичное отклонение увеличилось на 29% ($p<0,01$) и 20% ($p<0,05$), соответственно, что указывает на активизацию активных регуляторных механизмов.

Максимальные амплитуды колебаний эндотелиального, нейрогенного и миогенного генеза после нагрузки увеличились на 40% ($p<0,01$), 34% и 21% ($p<0,05$) у мальчиков, и 51%, 23% ($p<0,01$) и 35% ($p<0,001$), соответственно, у девочек. В группе девочек значения приведенных амплитуд колебаний стали достоверно выше во всех диапазонах активных факторов регуляции микрокровотока.

Для пульсовой волны у мальчиков отмечено увеличение значения максимальной амплитуды (на 10%, $p<0,05$) после нагрузки; у девочек наблюдалось снижение вклада нормированной амплитуды респираторного ритма на 16% ($p<0,01$).

Несмотря на то, что показатели микрососудистого тонуса в обследуемых группах достоверно не изменились, была отмечена выраженная тенденция к снижению нейрогенного и миогенного тонуса.

Отмеченные более высокие значения вариабельности микрокровотока при сравнительно одинаковом уровне перфузии в группе мальчиков и девочек после нагрузки указывают на более активное функционирование регуляторных влияний по сравнению с микрокровотоком до приседаний. Это свидетельствует о преобладании эрготропной направленности регуляции в условиях повышенных энергетических и метаболических процессов.

Заключение. Таким образом, в результате исследования выявлено увеличение амплитуд колебаний во всех активных диапазонах колебаний после функционального теста в группе мальчиков и девочек. Это можно рассматривать как компенсаторно-приспособительную реакцию, направленную на обеспечение физиологических потребностей тканей в условиях повышенной нагрузки и сохранение кровоснабжения органов и тканей.

Литература

1. *Крупаткин А. И., Сидоров В. В.* Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: Колебания, информация, нелинейность Руководство для врачей.— М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2014.— 498 с.
2. Возможности метода лазерной допплеровской флоуметрии в оценке половых отличий и возрастных изменений гемомикроциркуляции / С. С. Терехин, А. В. Станкевич, И. А. Тихомирова и др. // Ярославский педагогический вестник.— 2013.— Т. 3, № 1.— С. 100–106.

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ КОРТИКОЛИБЕРИНА В МОЗГЕ КРЫС В «СКРЫТЫЙ» ПЕРИОД РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПТСР И ЕГО КОРРЕКЦИИ

К. А. Баранова, Е. А. Рыбникова
Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

ksentippa@mail.ru

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) — это тревожная патология, отсроченная затяжная реакция на переживание чрезмерных по силе эмоционально травмирующих обстоятельств, ассоциирующихся с угрозой жизни. Принятой моделью ПТСР на животных является парадигма «стресс-рестресс» [1], в которой экспериментальное тревожное состояние возникает в результате действия тяжелого травматического стресса (ТС), и, через 7 суток, мягкого рестресса, напоминающего об интенсивном патогенном стрессе и являющегося триггером, запускающим проявление симптоматики ПТСР. До настоящего времени период между ТС и рестрессом не привлекал внимания исследователей, поскольку патологические симптомы на данном этапе отсутствуют. Тем не менее, именно в этот период формируется усиленная реактивность на рестресс и, следовательно, происходят ключевые патогенетические процессы, поэтому его можно называть «скрытым» периодом развития заболевания.

Процессы, происходящие в «скрытый» период, совершенно не изучены. Соответственно, малоисследованными остаются и механизмы, активация которых приводит к профилактике и компенсации патогенетических процессов, например, после прекондиционирования умеренной гипобарической гипоксией (ГП), предотвращающего формирование ПТСР [2]. Учитывая важную роль нейроэндокринных факторов, в особенности нейрогормона кортиколиберина, в адаптации к стрессам, в данной работе оценивали экспрессию его рецепторов в мозге крыс в «скрытый» период развития экспериментального ПТСР и у прекондиционированных животных, у которых патологическая реактивность и, соответственно, экспериментальный ПТСР, не формируется.

Эксперименты выполнены на взрослых самцах крыс Вистар. Крыс одной группы (ТС) подвергали ТС — 2 часа иммобилизационного стресса, 20 минут вынужденного плавания, и, после 15-мин перерыва, воздействие эфиром до потери сознания. За 24 ч до ТС животным второй (ГП-ТС) группы предъявляли ГП — 3 сеанса умеренной гипобарической гипоксии (360 мм рт. ст., 10% O_2, 2 ч, через 24 ч). Гистологическую обработку и иммуногистохимический анализ проводили как описано ранее [3]. Использовали первичные поликлональные антитела к кортиколибериновым рецепторам I/II типа (1:100, Santa Cruz, USA).

На 7-ой день после ТС выявлено значительное снижение числа интенсивно-иммунореактивных к рецепторам кортиколиберина (КЛР) нейронов в дорзальном (7% от контроля, рис. *а*) и вентральном (6%, *б*) гиппокампе, и неокортексе (около 17%, *в-г*) животных группы ТС. У крыс этой группы на 7-е сутки после стрессирования достоверно сниженным оказывалось также и общее число иммунопозитивных к КЛР нейронов в области CA1 и неокортексе (II–III слои). В группе ГП-ТС и интенсивность экспрессии КЛР (*а-г*, белые столбики), и общее число КЛР-позитивных клеток значимо не отличалось от контроля, и на 7 сутки после ТС оказывалось достоверно выше, чем у неГП животных. В гипоталамусе достоверных изменений уровня КЛР не выявлено. Снижение содержания КЛР в «скрытый» период развития ПТСР в экстрагипоталамических отделах мозга, возможно, играет роль в формировании нарушенной реактивности на рестресс, обуславливая в дальнейшем характерный для ПТСР дисбаланс регуляции ГАС, КЛР-опосредованные нарушения NF-κB каскада [3], функций NMDA рецепторов и др. Кроме того, принимая во внимание наличие контуров саморегуляции ГАС по принципам обратной связи, следствием редукции пула КЛР гиппокампа и неокортекса может являться ослабление тормозного экстрагипоталамического тонуса на КЛ- и вазопрессин-продуцирующие центры гипоталамуса, что приводит к гиперпродукции нейрогормо-

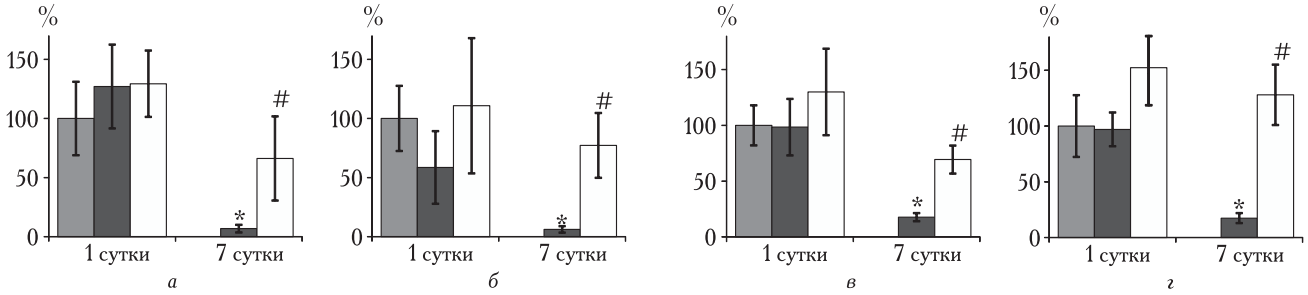


Рис. Изменения числа нейронов интенсивно-иммунореактивных к рецепторам кортиколиберина в области CA1 (*а*) и зубчатой извилине (*б*) гиппокампа, во II–III (*в*) и V (*г*) слоях неокортекса крыс в процессе формирования и коррекции экспериментального ПТСР. По оси абсцисс — дни после ТС; по оси ординат — количество интенсивно-иммунопозитивных к КЛР клеток в % от контроля. Черные столбики — группа ТС; белые столбики — ГП-ТС; серые столбики — контроль, 100%. * различия достоверны по отношению к контролю, # достоверно относительно группы ТС, $p \leqslant 0{,}05$.

нов ГАС, описанной для ПТСР как в клинике, так и в экспериментальной модели [4]. ГП предотвращает запуск этих патологических механизмов, обеспечивая нормальную реакцию стресс-систем мозга на слабый стресс.

Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-60095 и 16-04-00987.

Литература

1. *Liberzon I., Krstov M., Young E. A.* Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback // Psychoneuroendocrinology.— 1997.— Vol. 22 (6).— P. 443–453.
2. *Рыбникова Е. А., Миронова В. И., Тюлькова Е. И., Самойлов М. О.* Анксиолитический эффект умеренной гипобарической гипоксии у крыс в модели посттравматического стрессового расстройства // Журн. ВНД.— 2008.— Т. 58(4).— С. 475–482.
3. *Баранова К. А., Рыбникова Е. А., Чурилова А. В., Ветровой О. В., Самойлов М. О.* Проадаптивная роль нейрональных транскрипционных факторов CREB и NF-κB в моделях постстрессовых психопатологий на крысах // Нейрохимия.— 2014.— Т. 31 (1).— С. 23–30.
4. Mironova V., Rybnikova E., Pivina S. Effect of inescapable stress in rodent models of depression and posttraumatic stress disorder on CRH and vasopressin immunoreactivity in the hypothalamic paraventricular nucleus // Acta Physiol Hung.— 2013.— Vol. 100 (4).— P. 395–410.

ВЛИЯНИЕ 1-ДЕЗАМИНО-8-D-АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА НА РАЗВИТИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ВИТАЛЬНЫМ СТРЕССОМ, У КРЫС

Г. В. Безнин, С. Г. Белокоскова, С. Г. Цикунов
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

gbeznin@gmail.com

Введение. Изучение последствий переживания экстремальных психотравмирующих воздействий на человека, приводящих, в частности, к развитию посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), является одной из актуальных задач современной биомедицинской науки. Интерес представляет исследование патогенетических механизмов, лежащих в основе поведенческих отклонений и структурно-функциональных перестроек в центральной нервной системе (ЦНС) в результате психической травмы, а также поиск нейрофармакологических подходов компенсации и лечения патологии такого рода. Нами смоделирована ситуация психогенного витального стресса (ВС; переживание угрозы жизни) на крысах. Для коррекции вызванных ВС поведенческих и структурно-функциональных нарушений использован синтетический аналог аргинин-вазопрессина, обладающий анксиолитическими, антидепрессивными и нейропротективными свойствами [1, 2],— 1-дезамино-8-d-аргинин-вазопрессин (ДДАВП).

Цель исследования: выявить и охарактеризовать отклонения в поведении и структурно-функциональные изменения в ЦНС у крыс, вызванные острым ВС, на раннем сроке после воздействия, и оценить эффективность V_2-агониста ДДАВП в коррекции сформированного расстройства.

Объекты, материалы и методы. Работа выполнена на самцах крыс Спрег-Доули массой 200–250 г, возрастом 4–5 мес. Исследование проведено с соблюдением основных требований биомедицинской этики. Использованы модели психогенной травмы и ПТСР, вызванных ВС, у крыс [3]. Стрессирующим воздействием являлось нахождение крыс в ситуации гибели сородича от действий питона и переживание угрозы собственной жизни. В течение 9 дней после ВС крысам опытной группы интраназально вводили ДДАВП в дозировке $0{,}5–1\times10^{-7}$ г в сутки. Животным группы активного контроля после ВС аналогичным образом вводили физиологический раствор (ФР). Оценивали поведение животных в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Интрудер — резидент» и тесте Порсолта. Через 9 дней после ВС животных декапитировали, извлекали головной мозг и фиксировали его в цинк-этанол-формальдегиде. Приготавливали парафиновые срезы мозга, окрашивали их по Нисслю, проводили постановку иммуногистохимических реакций для выявления маркёров NeuN (neuronal nuclei) и PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Оценивали результаты гистологического исследования с помощью световой микроскопии. Результаты исследования обеих групп сравнивали между собой и с результатами исследования интактных животных.

Результаты и их обсуждение. Поведение крыс, получавших в постстрессовом периоде ФР, характеризовалось повышенными уровнями тревожности, агрессивности, в т. ч. демонстрацией патологической агрессии, сниженными уровнями двигательной активности, исследовательской деятельности, коммуникативности, признаками «депрессивности» поведения. У крыс, получавших ДДАВП, данные показатели соответствовали показателям поведения интактных животных, а депрессивноподобных отклонений в поведении не наблюдалось. В результате морфологического исследования головного мозга у животных, получавших ФР после ВС, выявлены гиперхромия/сморщивание нейронов гиппокампа, супраоптического ядра (СОЯ) гипоталамуса, нейронов неокортекса, ослабление реакции на NeuN в гиппокампе, неокортексе, снижение интенсивности (подавление) пролиферации в субвентрикулярной зоне (СВЗ) боковых желудочков

и в гиппокампе. В мозгу животных, получавших ДДАВП после ВС, повреждённые клетки в СОЯ гипоталамуса не обнаруживались или встречались единично. По плотности расположения повреждённых клеток в других областях, а также по интенсивности реакции на NeuN в местах её нарушения существенных различий у животных, получавших после стресса ДДАВП или ФР, не выявлено. Установлено, что интенсивность пролиферации в СВЗ боковых желудочков (но не в гиппокампе) у животных, получавших ДДАВП, находилась на интактном уровне, а в некоторых случаях была выше него.

Заключение. Воздействие острого ВС на крыс в эксперименте приводит к формированию у животных на сроке до 9 дней ПТСР, о чём свидетельствует развитие характерных поведенческих отклонений. В результате острой психогенной травмы у крыс в этот же период развиваются структурно-функциональные нарушения в головном мозге: повреждение и гибель клеток в гиппокампе, неокортексе, гипоталамусе, нарушение функциональной целостности (по данным постановки реакции на NeuN) нейронов гиппокампа, неокортекса, ослабление нейрогенеза. Введение крысам, подвергнутым воздействию ВС, в постстрессовом периоде агониста V_2-рецепторов ДДАВП предотвращает развитие поведенческих отклонений и, частично, структурно-функциональных нарушений в ЦНС: проявляется нейропротективным эффектом и стимуляцией процессов нейропластичности. Полученные результаты требуют проведения дальнейших исследований для уточнения влияния ДДАВП на развитие поведенческих и структурно-функциональных нарушений, наблюдающихся при постстрессовых расстройствах.

Литература

1. *Белокоскова С. Г., Степанов И. И., Цикунов С. Г.* Агонист V2-рецепторов вазопрессина редуцирует депрессивные расстройства у постинсультных больных // Вестн. РАМН.— 2012.— № 4.— С. 40–44.
2. *Zenina T. A., Gudasheva T. A., Bukreyev Y. S., Seredenin S. B.* Neuroprotective effect of dipeptide AVP(4–5)-NH2 is associated with nerve growth factor and heat shock protein HSP70 // Bull. Exp. Biol. Med.— 2007.— Vol. 144, № 4.— P. 543–545.
3. Изменения липидного спектра сыворотки крови и печени крыс, вызванные тяжелой психогенной травмой / Цикунов С. Г., Клюева Н. Н., Кусов А. Г., Виноградова Т. В., Клименко В. М., Денисенко А. Д. // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 2006.— Т. 141, № 5.— С. 575–578.

ОЦЕНКА ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКОГО ВУЗА

Р. М.Бердиев, В. А.Кирюшин

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, Россия

berdief@gmail.com

В настоящее время предложено много способов оценки состояния здоровья студенческой молодежи [1]. Рядом авторов описывается комплекс кардиографический для анализа вариабельности сердечного ритма «Варикард». Данный комплекс решает задачи по оценке адаптационных возможностей организма на основе анализа вариабельности сердечного ритма и съему электрокардиограммы [2]. С помощью «Варикарда» обеспечиваеттся ввод электрокардиосигналов с электродов в персональный компьютер для обработки с помощью программного обеспечения, входящего в состав комплекса. При обработке данных оцениваются адаптационные возможности организма на основе анализа вариабельности сердечного ритма [3, 4]. При анализе оценивается степень напряжения регуляторных систем, что позволяет объективно судить об адаптационных возможностях и функциональных резервах организма. Использование данного комплекса, ввиду его простоты и удобства использования, а также относительно небольших затрат является весьма распространенным для оценки уровня здоровья студентов [2, 4].

Цель исследования: оценка вариабельности сердечного ритма студентов медицинского вуза в период экзаменационной сессии.

Материалы и методы. В исследование вовлечены 300 студентов лечебного, медико-профилактического, стоматологического и педиатрического факультетов (по 60 студентов в каждой группе), в том числе 105 мужчин (35%) и 195 женщин (65%) в возрасте 18–20 лет (средний возраст 19,3 [18,4; 21,2] лет). В контрольную группу вошли 60 студентов, ведущих здоровый образ жизни и посещающие бассейн 2–3 раза в неделю. Исследование проводилось в период экзаменационной сессии. Применялся метод записи кардиоинтервалов по Р. М. Баевскому с помощью аппаратного комплекса «Варикард». Запись кардионтервалов проводилась в I стандартном отведении, испытуемый находился в положении сидя. Полученные результаты обработаны с помощью стандартных статистических пакетов программ Microsoft Excel 2016 и StatSoft Statistica 10.0. Для оценки показателей ВСР были использованы методы непараметрической статистики: определялись медиана (Me), 25-й и 75-й процентили. Для оценки статистической значимости различий независимых выборок был использован ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест).

Результаты. Как видно из таблицы, ЧСС во всех группах статистически значимо выше по сравнению с контролем ($p<0,01$), наиболее высокие значения по данному показате-

Таблица

Анализ вариабельности сердечного ритма студентов медицинского вуза

Показатель	Контроль	Факультеты			
		лечебный	медико-профилактический	стоматологический	педиатрический
ЧСС (уд/мин)	82,55 [73,45; 89,25]	90,44* [79,62; 104]	87,4* [77,69; 95,52]	94,03*,^ [88,26; 104]	97,37*,^ [80,73; 106]
Индекс напряжения, SI (у.е.)	71,86 [50,74; 138]	109* [53,35; 257]	67,83# [25,65; 163]	176*,#,^ [109; 348]	95,43& [50,46; 165]
Индекс централизации, IC (у.е.)	2,61 [1,56; 4,61]	1,51* [0,71; 2,88]	1,09*,# [0,4; 2,44]	1,71*,^ [1,07; 3,73]	0,81*,#,& [0,5; 3,37]
Общая мощность спектра, TP (мс^2)	7565 [2321; 24127]	4239 [1974; 21107]	5261 [2305; 18123]	3611* [2003; 13731]	5908 [2359; 16898]
ПАРС (у.е.)	4 [3; 5]	6* [4; 7]	6* [5; 7]	5*,^ [4; 6]	6* [4; 7]

Статистическая значимость различий по сравнению: * — с контролем, # — с лечебным факультетом, ^ — с медико-профилактическим факультетом, & — со стоматологическим факультетом.

лю отмечаются у студентов стоматологического и педиатрического факультетов. Индекс напряжения регуляторных систем (SI) наиболее высокий у студентов лечебного и стоматологического факультетов ($p<0,01$), что свидетельствует о смещении вегетативного баланса в сторону преобладания симпатической нервной системы и повышении централизации процесса регуляции сердечного ритма. Показателем усиления симпатических влияний на сердце и ослабления активности автономного контура регуляции может служить индекс централизации (IC), который статистически значимо отличается во всех опытных группах по сравнению с контролем. Интегральный показатель активности регуляторных систем (ПАРС), при расчете которого учитываются все наблюдаемые изменения в состоянии регуляции ритма сердца, имел у обследуемых студентов достаточно высокие значения, выходящие за пределы физиологической нормы ($p<0,01$).

Выводы. Стресс, являющийся следствием напряженной учебной деятельности в период экзаменационной сессии, может способствовать формированию функциональных изменений, приводящих к нарушению взаимодействия между регуляторными системами и развитию дизрегуляторной патологии, болезней адаптации, которые являются следствием недостаточности адаптационных резервов организма. Студенты, ведущие здоровый образ жизни и занимающиеся спортом, по ряду критериев ВСР имеют более благоприятные показатели.

Литература

1. *Johansson E. E., Hamberg K.* From calling to a scheduled vocation: Swedish male and female students reflections on being a doctor / E. E. Johansson, // Med. Teach.— 2007. — Vol. 29, № 1. — P. 1—8.
2. *Тюкалова М. А., Речкалов А. В.* Гендерные различия при оценке регуляторно-приспособительных возможностей студентов 17–20 лет // Вестник КГУ.— 2016.— № 7.— С. 11–13.
3. *Аль-Хулейди Н. А.* Система обработки и нейросетевого анализа биоэлектрических сигналов для решения задач медицинской диагностики: дис. … канд. тех. наук. Владимир, 2014.— 150 с.
4. *Дьячкова Т. В.* Изменение показателей вариабельности сердечного ритма студентов в процессе учебной деятельности // Успехи современной науки.— 2016.— Т. 2, № 3.— С. 50–53.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ МОЛИКСАН И ГЕПТРАЛ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ СОЛЯНОКИСЛЫМ ГИДРАЗИНОМ

П. А. Бугаев

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

petr-bugaev@mail.ru

Введение. Гидразин солянокислый, или гидразина гидрохлорид,— неорганическое соединение, представляет из себя бесцветные октаэдрические или игольчатые кристаллы, хорошо растворимые в воде. Солянокислый гидразин (СКГ) используется как восстанавливающий агент в органической химии для производства пестицидов, при производстве дезинфицирующих средств, в проявителях и т.д.

Как и все производные гидразина, СКГ является нейро- и гепатотоксичным веществом. Сведения о механизме действия и клинических проявлениях интоксикации данным веществом недостаточны для разработки медицинских препаратов, применение которых позволило бы снизить его токсичность. В этой связи возникает необходимость изучения его воздействия на орга-

низм, а также поиска средств, снижающих его токсичность.

Целью исследования явилось моделирование острого отравления СКГ, а также изучение эффективности гепатопротекторов гептрала и моликсана при остром отравлении СКГ.

Объекты, материалы и методы. Исследование выполнили на 48 белых беспородных крысах. Токсикант СКГ, водный раствор, 20 мг/мл, вводился внутрижелудочно один раз в сутки зондом в дозе 200 мг/кг (¼ ЛД50) в течение двух дней [1].

В качестве средств коррекции использовались следующие препараты и схемы введения.

— Моликсан (раствор для внутривенного и внутримышечного введения, 30 мг/мл, в ампулах по 2 мл) — вводили по двум схемам. Профилактическая: за 15 мин до затравки, интраназально, в дозе 24 мг/кг массы тела (80 мкл/100 г), микропипеткой («М — профилактика»); лечебная: сразу после введения токсиканта, внутрибрюшинно, в дозе 60 мг/кг (200 мкл/100 г), инсулиновым шприцом («М — лечение»).

— Гептрал — вводили также по двум схемам. Профилактическая: за 15 мин до затравки, внутрибрюшинно, в дозе 35 мг/кг (0,044 мл/100 г) («Г — профилактика»); лечебная: сразу после введения токсиканта, внутрибрюшинно, в дозе 35 мг/кг (0,044 мл/100 г) («Г — лечение»).

Животные были разделены на 6 групп (по 8 животных в каждой):

1. интактные (без введения каких-либо препаратов);
2. контрольные (СКГ без фармакологической коррекции);
3. СКГ+«М — профилактика»;
4. СКГ+«М — лечение»;
5. СКГ+«Г — профилактика»;
6. СКГ+«Г — лечение».

Оценивали суточную и трёхсуточную выживаемость. На 4-й день проводили эвтаназию животных, производили забор тканей печени с целью выявления морфологических изменений и определения печёночного индекса. Также производили забор крови для определения биохимических показателей: аланинтрансаминаза (АЛТ), аспартаттрансаминаза (АСТ), общий белок, общий билирубин, мочевина, щелочная фосфатаза (ЩФ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что при введении СКГ у крыс на 4-й день выявлялась массивная жировая дистрофия печени, увеличивался печёночный индекс, резко снижалась активность трансаминаз (АЛТ в контрольной группе в 7,9 раза ниже, чем в интактной, АСТ — ниже в 2,3 раза). Снижение активности трансаминаз, несмотря на тяжёлые поражения печени, связано с механизмом действия токсиканта. Производные гидразина вызывают снижение содержания пиридоксальфосфата в тканях, вследствие чего происходит ингибирование энзимов, кофактором которых он является: трансаминаз, декарбоксилаз аминокислот, аминооксидаз и др. [2]. Кроме того, о поражении печени свидетельствовало снижение содержания общего белка, а также повышение активности ЩФ в контрольной группе, по сравнению с интактной.

Заключение. Применяемые препараты коррекции повреждения печени показали эффективность в двух схемах: моликсан — в лечебной схеме, гептрал — в профилактической. Применение моликсана по лечебной схеме вызывало нормализацию активности ЩФ, уменьшение печёночного индекса. Применение гептрала по профилактической схеме вызывало нормализацию уровня общего белка и активности ЛДГ в плазме крови и уменьшение печёночного индекса.

Полученные результаты не позволяют в полной мере ответить на вопрос об эффективности и оптимальной схеме применения исследуемых препаратов. Таким образом, эффективность применения моликсана и гептрала при острых отравлениях СКГ требует дальнейшего изучения и проведения дополнительных исследований.

Литература

1. *Венгеровский А. И., Саратиков А. С.* Влияние гепатотоксинов на активность органеллоспецифических ферментов и метаболизм липидов печени // Вопр. мед. химии.— 1989.— Т.35, № 3.— С. 87–91.
2. *Куценко С. А.* Основы токсикологии.— СПб.: Фолиант, 2004.— 570 с.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОЛИКСАНА ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ДЛИТЕЛЬНЫМ УПОТРЕБЛЕНИЕМ ИЗОНИАЗИДА, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

П. А. Бугаев
Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

petr-bugaev@mail.ru

Введение. Изониазид (тубазид, гидразид изоникотиновой кислоты) — противотуберкулёзный лекарственный препарат. Показанием к применению является туберкулёз любой локализации [1]. Является препаратом первого ряда [2]. ЛД50 при внутрижелудочном введении для крыс составляет около 1600 мг/кг [3]. Основным побочным эффектом изониазида является развитие токсической гепатопатии. Как правило, она развивается в течение первых трёх месяцев применения изониазида. У лиц младше 35 лет осложнения развиваются редко.

Клинические признаки гепатита отмечаются в 0,1% случаев [4]. В этой связи возникает необходимость поиска средств, снижающих токсичность данного препарата.

Целью исследования явилось изучение эффективности моликсана при хроническом воздействии изониазида в опытах на крысах.

Объекты, материалы и методы. Исследование выполняли на 42 белых беспородных крысах. Изониазид вводили подкожно в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг, 150 мг/кг в течение 14 дней. Моликсан в дозе 30 мг/кг вводили сразу после введения изониазида, внутрибрюшинно, в течение 14 дней. Животные были разделены на 7 групп по 6 животных в каждой: контрольные группы: 1-я, 2-я и 3-я; опытные группы: 4-я, 5-я и 6-я; интактная группа — 7-я. В 1-й и 4-й группах изониазид вводился в дозе 50 мг/кг, подкожно, ежедневно в течение 14 дней; во 2-й и 5-й группах — по той же схеме, в дозе 100 мг/кг; в 3-й и 6-й группе — по той же схеме, в дозе 150 мг/кг. В опытных группах (4-я, 5-я и 6-я) сразу после введения изониазида вводили моликсан в дозе 30 мг/кг, ежедневно в течение 14 дней. В 7-й группе (интактной) животным не вводилось каких-либо препаратов. В ходе эксперимента оценивали двухнедельную выживаемость, ежедневно оценивали массу тела животных, неврологический статус. Эвтаназию проводили на 15-й день эксперимента, производили забор тканей печени с целью выявления морфологических изменений, определения печёночного индекса. Также производили забор крови для определения биохимических показателей: АЛТ, АСТ, общий белок, общий билирубин, прямой билирубин, щелочная фосфатаза (ЩФ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что при введении изониазида в дозе 150 мг/кг моликсан положительно влиял на двухнедельную выживаемость крыс, которая в экспериментальной группе составила 100%, в то время как в контрольной — 67%.

Кроме того, моликсан показал выраженное противосудорожное действие. При введении изониазида в дозе 150 мг/кг в контрольной группе судорожный синдром отмечался на 6-й, 8–10-е, 12-й и 13-й дни эксперимента, в то время как в опытной группе судорожный синдром отмечался только на 9-й и 12-й дни.

Динамика массы тела крыс в эксперименте, а также показатель печёночного индекса в опытной и контрольной группах различались незначительно, однако при изучении биохимических показателей в крови получавших изониазид животных выявлены сдвиги в активности трансаминаз. Так, при введении изониазида в дозе 50 мг/кг уровень АЛТ в опытной группе был в 1,3 раза ниже по сравнению с контрольной, АСТ — в 1,8 раза ниже, щелочная фосфатаза — в 1,3 раза ниже, ЛДГ — в 1,2 раза ниже. При введении изониазида в дозе 100 мг/кг уровень АЛТ в опытной группе был в 1,3 раза ниже по сравнению с контрольной, АСТ — в 1,8 раза ниже, ЩФ — на одном уровне, ЛДГ — в 2,4 раза ниже. При введении изониазида в дозе 150 мг/кг уровень АЛТ в опытной группе был в 1,7 раза ниже по сравнению с контрольной, АСТ — в 1,7 раза ниже, ЩФ — в 1,2 раза ниже, ЛДГ — в 2 раза ниже. Различия в показателях уровня общего белка, общего и прямого билирубина были незначительными.

Заключение. Таким образом, применение моликсана при интоксикациях, вызванных длительным приёмом изониазида, оказывает гепатопротекторное действие, что подтверждается восстановлением функции печени и устранением цитолитического эффекта токсиканта.

Литература

1. Изониазид. Справочник лекарств РЛС: инструкция, применение и описание вещества Изониазид // http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_627.htm.
2. Приказ Минздрава РФ от 21.03.2003 № 109 (ред. от 29.10.2009) «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» // http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_100829/.
3. *Бун М. М., Бенеманский В. В., Юшков Г. Г., Убашеев И. О., Гущин А. С., Гущин А. А.* Морфофункциональные изменения у экспериментальных животных при воздействии изониазида и изониазида с витамином В6 // Вестн. Бур. гос. с.-х. акад. им. В. Р. Филиппова.— 2008.— № 4.— С. 3–9.
4. *Суханов Д. С., Оковитый С. В.* Гепатотропные средства в терапии поражений печени противотуберкулёзными препаратами.— СПб.: Тактик-Студио, 2012.— 64 с.

АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПАЦИЕНТОВ ЧЕРЕЗ 4–8 ЛЕТ ПОСЛЕ БАРИАТРИЧЕСКИХ ОПЕРАТИВНЫХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ

[1]Е. В. Васильев, [2]Д. А. Вологжанин, [1]Д. В. Гладышев, [2]Н. С. Ильинский, [2]В. В. Салухов, [2]Е. Г. Слесарева, [3]М. Б. Фишман, [1]С. Г. Щербак

[1]Городская больница № 40, Санкт-Петербург, Россия

[2]Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

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

nika_il2@mail.ru

Актуальность. По данным Всемирной организации здравоохранения в течение последних 35 лет количество людей, страдающих ожирением, удвоилось. В 2015 году 39% населения земного шара в возрасте старше 18 лет имели избыточный вес и 13% страдали от ожирения. Среди возможных методов лечения ожирения наиболее

эффективными являются бариатрические оперативные вмешательства (БОВ) [1, 2].

Материалы и методы. Проведено комплексное обследование 20 пациентов, страдавших ожирением и перенесших 4–8 лет назад БОВ. В группу вошли 6 мужчин и 14 женщин; средний возраст 43,14±9,76 лет (95% ДИ: 37,5;48,8). До выполнения БОВ ожирение 1 ст. имелось у 3 чел. (15%), 2 ст.— у 5 чел. (25%), 3 ст.— у 12 чел. (60%). Лапароскопическое регулируемое бандажирование желудка было выполнено 4 пациентам, лапароскопическая продольная резекция желудка — 11 пациентам, лапароскопическое желудочное шунтирование — 5 пациентам. С целью анализа отдаленных исходов БОВ, пациенты разделялись на следующие группы: выполнившие операцию в период от 4 до 5 лет назад, составившие первую группу — 9 чел. (45%), прооперированные от 5 до 6 лет назад (вторая группа) — 5 чел. (25%), и третья группа — от 6 до 8 лет — 6 чел. (30%).

Результаты. Средняя масса тела (МТ) в группе до операции составляла 122,7±20,2 кг (95% ДИ: 111,5; 133,9), средний ИМТ 41,18±5,64 кг/м^2 (95% ДИ: 38,05; 44,3); среднее значение окружности бедер (ОБ) 129,8±14,3 см (95% ДИ: 123,1; 135,4), средняя окружность талии (ОТ) 121,1±13,5 см (95% ДИ: 114,5; 130,2); среднее отношение ОТ/ОБ 1,07±0,087 (95% ДИ: 0,807; 0,914).

Через 4–8 лет после проведенной БОВ при повторном исследовании зарегистрированы следующие показатели: средняя МТ после операции составила 97,17±22,48 кг (95% ДИ 85,39;108,9); средний ИМТ 33,16±6,72 кг/м^2 (95% ДИ: 29,3;37,05); среднее значение ОБ 119,6±15,6 см (95% ДИ: 110,6; 128,6), средняя ОТ 103,1±17,6 см (95% ДИ: 92,9; 113,2); среднее отношение ОТ/ОБ 0,86±0,092 (95% ДИ: 0,807;0,914).

В среднем снижение МТ отмечалось на 27,45±15,89 кг, снижение ИМТ на 7,85±4,1 кг/м^2. Пациенты, исходно имевшие 1 ст. ожирения, показали наилучшие результаты лечения — при настоящем обследовании 1 чел. (33,3%) имел нормальную МТ, 2 чел. (66,7%) — избыточную массу тела (ИзбМТ). Из 5 чел. с исходной 2 ст. ожирения в отдаленном периоде 1 чел. (20%) имел ИзбМТ, 3 чел. (60%) — 1 ст. ожирения, у 1 чел. (20%) состоялось увеличение массы тела до 3 ст. ожирения. В группе лиц с изначальной 3 ст. ожирения исходы широко варьировали: ИзбМТ имели 3 чел. (25%), 1 ст. ожирения — 2 чел. (16,7), 2 ст. ожирения — 5 чел. (41,6%) и 3 ст. ожирения выявлена у 2 пациентов (16,7%).

Анализ динамики антропометрических данных в изучаемые периоды после БОВ показал следующие результаты. В первой группе (спустя 4–5 лет) среднее снижение МТ составило 25,45±12,56 кг (ИМТ 6,74±3,47 кг/м^2); во второй группе — 32,95±14,43 Кг (ИМТ 10,68±5,87 кг/м^2); в третьей группе — 20,15±10,32 Кг (ИМТ 5,74±3,48 кг/м^2). Только у одной пациентки наблюдался набор массы тела выше первоначального значения (100 кг — до операции, 119 — после лапароскопического регулируемого бандажирования желудка). Следует отметить, что после БОВ пациентка не состояла под медицинским динамическим наблюдением и рекомендации не выполняла.

Применение парного критерия Вилкоксона подтвердило высокую статистическую значимость динамики антропометрических показателей после БОВ: массы тела (ρ=0,0002), ИМТ (ρ=0,00039), ОТ/ОБ (ρ=0,0004).

При этом результаты БОВ были оценены как хорошие 6 пациентами, как удовлетворительные — 12 чел., неудовлетворительные — 2 чел. Сравнение эффективности различных видов БОВ не проводилось в связи с малым количеством выборки.

Выводы. Таким образом, полученные результаты показывают высокую эффективность БОВ как по динамике антропометрических данных, так и по субъективной оценке пациентами. Выявлено, что наибольшая регрессия МТ и ИМТ наблюдалась у пациентов спустя 5–6 лет после БОВ, затем происходило постепенное нарастание МТ. Однако для оценки статистической значимости этой закономерности необходимо увеличение выборки. Отсутствие динамического наблюдения пациентов (с целью контроля снижения массы, корректировки стереотипов пищевого поведения, применения других методов лечения) после БОВ является, по-видимому, негативным прогностическим фактором, ухудшающим отдаленные результаты оперативного лечения. Следует заключить, что данная проблема является недостаточно изученной и требует дальнейшей разработки.

Литература

1. *Евдошенко В. В., Федоров А. В.* Эволюция хирургии ожирения в России // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова.— 2006.— № 1.— С. 28–36.
2. *Bennett J. M., Mehta S., Rhodes M.* Surgery for morbid obesity // Postgrad Med J.— 2007.— Vol. 83, № 975.— P. 8–15.
3. *Кривцова Е. В.* Современные позиции бариатрической медицины // Лечащий врач.— 2007.— № 6.— С. 76–81.
4. *Шихирман Э. В., Пучков К. В.* Ближайшие и отдаленные результаты хирургического лечения ожирения // Московский хирургический журнал.— 2015.— № 1 (41).— С. 29–35.
5. *Huxley R.* Body mass index, waist circumference and waist:hip ratio as predictors of cardiovascular risk / Huxley R. et al.— Eur J Clin Nutr.— 2010.— Vol. 64, № 1.— P. 16–22.

НАРУШЕНИЯ СНА И КАЧЕСТВО ЖИЗНИ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ БАРИАТРИЧЕСКИЕ ОПЕРАТИВНЫЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВА

[1]Е. В.Васильев, [2]Д. А.Вологжанин, [1]Д. В.Гладышев, [2]Н. С.Ильинский, [2]В. В.Салухов, [2]Е. Г.Слесарева, [3]М. Б.Фишман, [1]С. Г.Щербак

[1]Городская больница № 40, Санкт-Петербург, Россия

[2]Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

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

nika_il2@mail.ru

Актуальность. Нарушения сна у больных ожирением являются одним из факторов, снижающих качество жизни пациентов, а также способствующих увеличению потребления пищи и оказывающих негативное влияние на динамику веса в процессе лечения ожирения [1]. Это согласуется с данными зарубежных исследований, подтверждающих ассоциированность расстройств сна с увеличением риска развития ожирения и сахарного диабета 2 типа (СД2) [2, 3]. Вместе с тем, в литературе нет единого мнения о характере нарушений сна и качества жизни на фоне снижения массы тела пациентов в отдаленные сроки после выполнения бариатрических оперативных вмешательств (БОВ).

Материалы и методы. Проведено комплексное обследование 20 пациентов, страдавших ожирением и перенесших 4–8 лет назад бариатрические оперативные вмешательства (БОВ). В группу вошли 6 мужчин и 14 женщин; средний возраст 43,14±9,76 лет (95% ДИ: 37,5; 48,8). До выполнения БОВ ожирение 1 ст. имелось у 3 чел. (15%), 2 ст.— у 5 чел. (25%), 3 ст.— у 12 чел. (60%). Лапароскопическое регулируемое бандажирование желудка было выполнено 4 пациентам, лапароскопическая продольная резекция желудка — 11 пациентам, лапароскопическое желудочное шунтирование — 5 пациентам. Давность выполнения БОВ: в период от 4 до 5 лет назад — 9 чел. (45%), от 5 до 6 лет — 5 чел. (25%), от 6 до 8 лет — 6 чел. (30%). В протокол обследования входил подробный сбор анамнеза по стандартизированным дескрипторам, а также физикальное обследование (в том числе развернутая антропометрия). Всем пациентам выполнялось обследование с помощью шкалы сонливости Epworth, Берлинского опросника апноэ сна, русской версии опросника «The Medical Outcomes Study 36-Item Short-Form Health Survey» (MOS SF-36). Для статистической обработки применялись параметры описательной статистики, критерий Шапиро — Уилка, t-критерий Стьюдента, критерий ранговой корреляции Спирмена.

Результаты. На момент данного исследования нормальная масса тела регистрировалась у 1 чел. (5%), избыточная масса тела — у 6 чел. (30%), ожирение 1 ст. имелось у 5 чел. (25%), 2 ст.— у 4 чел. (20%), 3 ст.— у 4 чел. (20%).

С помощью шкалы Epworth выявлено, что у 2 чел. из обследованной группы (10%) имеется выраженная дневная сонливость, у 8 чел. (40%) — умеренная, у 10 чел. (50%) дневная сонливость отсутствует. Анализ результатов, полученных при помощи Берлинского опросника апноэ сна показал, что 11 чел. (55%) имели низкий риск нарушений дыхания во время сна, у 9 чел. (45%) риск был высоким. Сочетание высокого риска нарушений дыхания во сне, выявленного с помощью Берлинского опросника, и повышенной дневной сонливости (более 8 баллов по шкале Epworth), выявлено у 7 пациентов. ИМТ этих лиц варьировал в широких пределах от 21,9 до 47,5 кг/м^2, явной взаимосвязи между динамикой антропометрических показателей и расстройствами сна не установлено.

Результаты исследования качества жизни искомой группы сравнивались с данными средних популяционных значений, представленными Амирджановой В. Н. с соавт. (2008). Статистически значимых различий не выявлено.

С помощью рангового критерия Спирмена выявлены: умеренной силы отрицательная взаимосвязь между оценкой риска по Берлинскому опроснику и шкалой «физический компонент здоровья» опросника MOS SF-36 (r_s=-0,56, $p<0,05$), прямая умеренной силы связь между оценкой риска по Берлинскому опроснику и средним баллом дневной сонливости Epworth (r_s=0,606, $p<0,05$), отрицательная умеренной силы корреляция между оценкой по шкале «физическое функционирование» опросника MOS SF-36 и оценкой по шкале Epworth (r_s=-0,43, $p<0,05$). Регистрировались значимые взаимосвязи и с антропометрическими данными. Обнаружена отрицательная умеренной силы взаимосвязь между оценкой по шкале «физическое функционирование» опросника MOS SF-36 и массой тела (r_s=-0,49, $p<0,05$), а также с ИМТ (r_s=-0,44, $p<0,05$).

Выводы. В отдаленном периоде после БОВ не получено убедительных данных о взаимовлиянии расстройств сна и динамики антропометрических показателей. Показатели качества жизни пациентов, перенесших БОВ, в отдаленном периоде не отличаются от популяционных значений. Установленная отрицательная корреляция между показателями MOS SF-36 как с антропометрическими данными (в частности, массой тела и ИМТ), так и с выраженностью дневной сонливости, позволяет судить о значимом влиянии повышенной массы тела и выраженности расстройств сна на снижение качества жизни пациентов.

Литература

1. *Егиев В. Н.* Взаимозависимость показателей качества жизни пациентов, массы тела и сопутствующих заболеваний в различные сроки после оперативного лечения по поводу морбидного ожирения / В.Н. Егиев [и др.]. //Ожирение и метаболизм.— 2015.— Т. 12, № 2.— С. 20–23.
2. *Killick R., Banks S., Liu P. Y.* Implications of sleep restriction and recovery on metabolic outcomes // J Clin Endocrinol Metab.— 2012.— Vol. 97, № 11.— P. 3876–90.

3. *Gifford A. H., Leiter J., Manning H. L.* Respiratory function in an obese patient with sleep-disordered breathing // Chest.— 2010.— Vol. 138, № 3.— P. 704–715

4. *Амирджанова В. Н.* Популяционные показатели качества жизни по опроснику SF-36 / В. Н. Амирджанова [и др.]. // Научно-практическая ревматология.— 2008.— № 1.— С. 36–48.

НОВЫЙ НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА С ПОМОЩЬЮ ЗВУКА

А. С. Гекалюк, М. В. Уланова, В. И. Разубаева, В. А. Федорова, А. А. Широков, О. В. Семячкина-Глушковская
Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия

gekalyuk.a@mail.ru

Непреодолимость гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) для препаратов является основной проблемой лечения поражений мозга. Поэтому перед современными учеными стоит задача о безопасном «открытии» ГЭБ с целью доставки препаратов в ткани мозга [1].

Существуют ряд методов для временного повышения проницаемости ГЭБ при помощи ультразвуковых волн [2]. В этих методах повышение проницаемости ГЭБ достигается путем воздействия ультразвука 1–3 МГц в сочетании с микрочастицами, заполненным газом. Но данные методы работают по принципу «сигаретного прожигания», в локальной точке мозга и эффективны лишь в случае введения микрочастиц непосредственно в сонную артерию, несущую кровь непосредственно в мозг. Таким образом, несмотря на эффективность указанных способов, они обладают лимитирующими характеристиками: необходимость введения инородных частиц, локальное инвазивное воздействие и сложности технического выполнения [3].

В данной работе была поставлена **цель** разработать альтернативный неинвазивный метод для временного открытия ГЭБ с помощью звука (110 дБ, 370 Гц).

Материалы и методы. Эксперименты проводили на 40 половозрелых самцах мышей, которые были разделены на 4 группы. Первая группа (n=10) служила контролем (интактные животные), вторая группа (n=10) — сразу (0 часов) после звукового воздействия, третья группа (n=10) — 8 часов после звукового воздействия, четвертая группа (n=10) — 24 часа после звукового воздействия. С целью повышения проницаемости ГЭБ на животных воздействовали прерывистым звуком (110 дБ, 370 Гц). Полное описание метода приводится в данной статье [4].

Для оценки проницаемости ГЭБ использовались **методы**:

1) Метод внутривенного введения красителя Evans Blue (1% Evans blue в 0,1 М растворе фосфатного буфера) с дальнейшей спектрофотометрической оценкой проницаемости краски в ткани мозга

2) Применение конфокальной микроскопии в целях изучения проницаемости ГЭБ для низкомолекулярных веществ с использованием Dextran (70 кДа) и липосом, состоящих из Me4-BODIPY-8-фосфатидилхолина. (100 нм), введенных внутривенно.

3) Использование МРТ для определения проницаемости ГЭБ для гадолиния 750 Да.

4) Гистологический метод для оценки проницаемости сосудов для воды.

Результаты исследования. У животных второй группы (0 часов) после звукового воздействия, наблюдалось повышение проницаемости ГЭБ, что подтверждалось проникновением в ткани мозга как высокомолекулярных (Evans Blue — 8,5 кДа, Dextran — 70 кДа) так и низкомолекулярных веществ (липосомы — 100 нм, гадолиний — 750 Да), а также воды, по данным морфологического анализа наблюдался периваскулярный отек. Далее к 8 часам (3 группа) проницаемость ГЭБ была закрыта для всех исследуемых веществ, кроме воды. В этот период исследований по-прежнему наблюдался периваскулярный отек. К 24 часам (4 группа) отмечалось восстановление барьерной функции мозга.

Выводы. Проведённые исследования показали возможность неинвазивного повышения проницаемости ГЭБ на короткий период времени для высокомолекулярных (Evans Blue — 68,5 кДа, Dextran — 70 кДа) и низкомолекулярных веществ (липосомы — 100 нм, гадолиний — 750 Да) с помощью прерывистого звука (17 Гц, 120 дБ), действующего в течение 2 дней по 2 часа.

Литература

1. *Weiss N., Miller F., Cazaubon S. et al.* Theblood-brain barrier in brain homeostasis and neurologicaldiseases // Biochim Biophys Acta.— 2009.— № 4.— P. 842–857.

2. *Howles G. P., Bing K. F., Qi Y. et. al.* Contrast-enhanced in vivo magnetic resonance microscopy of the mouse brain enabled by non-invasive opening of the blood-brain barrier with ultrasound // Magnetic Resonance in Medicine.— 2010.— № 64.— P. 995–1004.

3. *Shi l., Mancheno P. P., Badami J. et al.* Quantification of transient increase of the blood–brain barrier permeability to macromolecules by optimized focused ultrasound combined with microbubbles // International Journal of Nanomedicine.— 2014.— № 9.— P. 4437–4448.

4. *Semyachkina-Glushkovskaya O. V., Sindeeva O. A., Gekalyuk A. S. et. al.* Blood-brain barrier and cerebral blood flow: age differences in hemorrhagic stroke // Journal of Innovative Optical Health Sciences.— 2015.— Vol. 8, № 6.— P. 1–10.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА: ДИАБЕТИЧЕСКАЯ СТОПА

М. А. Горячева, М. А. Ковалева, Я. А. Гущин, М. Н. Макарова
Научно-производственное объединение «Дом фармации», Санкт-Петербург, Россия
spbpharm@mail.ru

Введение. У пациентов с диабетом одним из осложнений, ведущим к инвалидизации, является синдром диабетической стопы. При данном состоянии наблюдается комплекс анатомо-функциональных изменений на фоне длительной гипергликемии, приводящей к развитию нейропатии, микро- и макроангиопатий, остеоартропатии, что приводит к повышенной травматизации и инфицированию мягких тканей стопы. Разработка мероприятий (в том числе фармакологической терапии), направленных на снижение возникновений осложнений при диабете, является актуальной задачей. Следует отметить, что именно экспериментальная диабетология позволяет определить ряд аспектов патогенеза, клинических проявлений и терапии, как самого диабета, так и профилактики и терапии его осложнений [1, 2].

Цель исследования: разработка неинфекционной экспериментальной модели синдрома диабетической стопы с развитием ангио- и нейропатии на фоне экспериментального стрептозотоцин(СТЗ)-индуцированного диабета.

Объекты, материалы и методы. Исследование выполнено на 30 самцах крыс линии Wistar. Животные были разделены на 2 группы: интактные крысы — без патологии; экспериментальные — животные с модельной патологией. Формирование экспериментальной патологии у животных экспериментальной группы проводили путем введения СТЗ (Sigma, США) в дозе 60 мг/кг, однократно, внутрибрюшинно, спустя 15 мин после введения никотинамида (Sigma, США) в дозе 230 мг/кг (внутрибрюшинно). С целью выявления биохимических и гистологических признаков диабета и его поздних осложнений (ангиопатии и нейропатии) у экспериментальных животных были проведены исследования в динамике. Определяли концентрацию глюкозы в периферической крови, гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}). Иммуногистохимическое исследование включало в себя определение экспрессии нейронального маркера PGP 9.5 с использованием моноклональных антител производства фирмы Abcam. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводилось при помощи светооптического микроскопа Carl Zeiss (Германия).

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования установлено, что в ответ на однократное введение СТЗ у экспериментальных животных развивалась гипергликемия. К 5-й неделе (после введения СТЗ) концентрация глюкозы в периферической крови животных контрольной группы была статистически значимо выше, в 4,5 раза больше, чем у животных интактной группы, и составила 23,2±1,7 ммоль/л (при $p<0,05$). Данные изменения сохранялись до конца исследования (14-я неделя). Гипергликемия сопровождалась статистически значимым увеличением концентрации HbA1c у контрольных крыс более чем в 2 раза и составила 7,4±0,1% (при $p<0,05$). В ходе осмотра животных, начиная с 10-й недели исследования, в группе контрольных крыс наблюдали: бледность кожных покровов (одной или двух задних конечностей), в 60% случаев обнаружены раневые поверхности. К 14-й неделе у двух животных экспериментальной группы наблюдали образование язв на подошвенной поверхности задней конечности. Гистологическая оценка (на 14-й неделе исследования) подтвердила наличие изменений, характерных для диабетической патологии. В контрольной группе наблюдали типичные проявления микроангиопатии, характерные для синдрома диабетической стопы: продуктивный капиллярит со слабо выраженным периваскулярным склерозом, а также склероз стенок артериол. В тканях выявлена периваскулярная лимфо-гистиоцитарная инфильтрация от слабой до умеренной выраженности, частично затрагивающая перинеральные зоны. Установлены выраженный гиперкератоз и слабо выраженный акантоз, местами с вовлечением в процесс придатков кожи (волосяных фолликулов, сальных и потовых желез). Патологический процесс частично затрагивал костно-суставную структуру в виде дистрофических изменений хрящевой ткани. Также была выявлена аксональная дегенерация, демиелинизация и очаговый некробиоз аксонов, наблюдались дистрофические нарушения в дерме. Морфометрическое исследование периферических нервов стоп выявило снижение среднего количества нервов (в 5 раз) по сравнению с интактной группой (13,7±2,1 и 2,5±0,7 соответственно; $p<0,05$) и уменьшение диаметра аксона в нерве на 33% (7,5±0,0 и 5,0±0,0 мкм соответственно; $p<0,05$). Следует отметить, что интраэпидермальная плотность нервных волокон была снижена (в 2,6 раза) по сравнению с интактной группой (1,6±0,2 и 0,6±0,1, соответственно; $p<0,05$). Иммуногистохимическое исследование с применением маркера PGP 9.5 у контрольных животных подтвердило развитие нейропатии, что нашло отражение в снижении плотности нервных волокон за счет аксональной дегенерации, демиелинизации и очагового некробиоза.

Заключение. Таким образом, обнаруженные в нашей работе структурные изменения капилляров и дегенеративные изменения аксонов позволяют сделать вывод о том, что длительнотекущий (14 недель) СТЗ-индуцированный диабет приводит к развитию ангио- и нейропатий с развитием синдрома диабетической стопы.

Литература

1. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 / Спасов А. А., Воронкова М. П., Снигур Г. Л., Чепляева Н. И., Чепурнова М. В. // Биомедицина.— 2011.— № 3.— С. 12–18.
2. *Chatzigeorgiou A., Halapas A., Kalafatakis K., Kamper E.* The use of animal models in the study of diabetes mellitus // *In Vivo*.— 2009.— Vol. 23.— P. 245–258.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ КОФЕРМЕНТА Q10 В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА КРЫС

А. В. Калатанова, И. Е. Макаренко, Я. А. Гущин, Н. М. Фаустова
Институт экспериментальной фармакологии, Санкт-Петербург, Россия

spbpharm@mail.ru

Введение. Реперфузионное повреждение миокарда, возникающее вследствие кратковременной ишемии, как и большинство сердечно-сосудистых заболеваний, сопровождается значительным снижением содержания убихинола (коэнзим Q10) в миокарде. Коэнзим Q10, выступающий в качестве антиоксиданта, предотвращающего повреждение биологических мембран, оказывает противоишемическое, кардиопротективное и антигипертензивное действие [1], что обусловливает перспективность его медицинского применения.

Целью данного исследования стало доклиническое исследование эффективности препарата убихинол, 1%-й раствор в липосомальной форме на модели ишемии с последующей реперфузией миокарда крыс.

Объекты, материалы и методы. Исследование проводилось с использованием в качестве биологической тест-системы 90 самцов аутбредных крыс в возрасте 15–17 недель, составивших 9 экспериментальных групп по 10 животных: интактная, ложнооперированная, контрольная — с индукцией патологии без лечения, и 6 групп крыс с индукцией патологии и лечением. Исследовали эффективность 1%-го раствора липосомальной формы убихинола для внутривенного введения, разработанного в ЗАО «НПО „Дом фармации“»; препарат применяли в 3 дозах: 1, 3 и 9 мг/кг. В качестве препаратов сравнения были использованы Милдронат® (Гриндекс, Латвия) в дозе 70 мг/кг и Мексидол® (ЭПМБП, Россия) в дозе 45 мг/кг. Введение препаратов в указанных дозах производилось внутривенно двукратно: за 10 мин до и через 3 ч после реперфузии миокарда. Оперативное вмешательство проводили на наркотизированных животных. Ишемию-реперфузию миокарда осуществляли путем 30-минутного лигирования левой коронарной артерии с последующим ослаблением лигатуры. В качестве критериев оценки действия препаратов исследовали: элевацию сегмента «ST» при электрокардиографии (ЭКГ) во втором отведении через 40 мин и 24 ч, регистрацию артериального давления (АД) через 24 ч и определение биохимических показателей крови: аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), креатинкиназа (КК), оксид азота (NO) через 4 и 24 ч после формирования патологии. Также гистохимически (окраска ТТС) была оценена площадь повреждения миокарда. Межгрупповые различия анализировались с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA; Statistica 6.0, США). Различия были определены при уровне значимости $p \leqslant 0{,}05$.

Результаты исследования. Смертность животных при моделировании ишемии-реперфузии миокарда не превышала 30%. Через 4 ч после реперфузии миокарда наблюдались фоновые изменения уровня АСТ, ЛДГ, NO и КК плазмы крови, обусловленные оперативным вмешательством (группа ложнооперированных животных). Через 24 ч при анализе данных ЭКГ и биохимических показателей крови межгрупповые отличия зафиксированы не были. АД животных контрольной группы было статистически значимо ниже, чем у интактных; иных межгрупповых отличий АД зафиксировано не было.

Введение лекарственных препаратов повлияло на активность КК, уровень NO плазмы крови через 4 ч, элевацию сегмента «ST» при анализе ЭКГ через 40 мин и площади поражения миокарда через 24 ч после реперфузии. Результаты представлены в табл.

Выявленные изменения позволяют сделать вывод о наличии у тестируемого препарата кардиопротекторного действия, отличающегося выраженной дозозависимостью. Эффекты препарата характеризовались выраженным позитивным влиянием на ЭКГ-признаки инфаркта, снижением цитолиза кардиомиоцитов, влияни-

Таблица

Результаты исследования; n=10

Группы	Доза, мг/кг	40 минут: Элевация ST, мм	4 часа: КК, нкат/л	4 часа: NO, мкМ	24 часа: Площадь поражения миокарда, %
Интакная	—	0,03±0,005[1]	420±21[1]	63±8[1]	2±1[1]
Ложнооперированная	—	0,05±0,002	1815±270[1]	67±5[1]	2±2[1]
Контрольная	—	0,11±0,008	3028±217	178±18	30±3
Убихинол в липосомальной форме	1	0,09±0,025	1634±152[1]	79±8[1]	30±2
	3	0,07±0,010	1551±240[1]	78±5[1]	25±2
	9	0,05±0,008[1]	750±17[1]	70±3[1]	20±2[1]
Милдронат®	70	0,12±0,015	2005±197[1]	41±7[1]	26±1
Мексидол®	45	0,09±0,009	997±79[1]	31±5[1]	13±2[1]

Примечание: [1] - Статистические значимое отличие от контрольной группы ($p<0{,}05$), критерий Тьюки.

ем на высвобождение NO. Площадь поражения миокарда под влиянием исследуемого препарата снижалась. Препараты сравнения Милдронат® и Мексидол® обладали характерной для них фармакологической активностью.

Заключение. В результате проведенного доклинического исследования фармакологической активности препарата убихинола в липосомальной форме при внутривенном введении на модели реперфузионного повреждения миокарда крыс показана его эффективность по ключевым показателям. Кардиопротекторный эффект исследованного препарата носил дозозависимый характер и был сопоставим с зарегистрированными в РФ референтными препаратами Мексидол® и Милдронат® в терапевтических дозах.

Литература

1. *Ullman U., Metzner J., Schulz C.* A new coenzyme Q10 tablet-grade formulation (all-Q) is bioequivalent to Q-Gel and both have better bioavailability properties than Q-Sorb // J. Med. Food.— 2005.— Vol. 8, № 3.— P. 397–399.

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА ВЕНТИЛЯТОРНЫЙ ОТВЕТ ПРИ ГИПЕРКАПНИИ

А. А. Клинникова, Г. А. Данилова
Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

galdanilova@rambler.ru

Известно, что системное воспаление влияет на функцию дыхания. При системном воспалении характерны серьезные нарушения функций дыхания, такие как: гипервентиляция, тахипноэ, апноэ (остановка дыхания), развитие гипоксических состояний. Гиперкапническая хеморецепция является ключевым элементом вентиляционной системы управления дыханием и поддержания гомеостаза организма при влиянии на него воспаления. При этом, практически не изучены хеморецепторные механизмы регуляции в условиях системного воспаления.

Целью настоящего исследования было изучение действия липополисахаридной модели воспаления на вентиляторный ответ при гиперкапнической стимуляции.

Эксперименты проводились на наркотизированных крысах линии Wistar. Липополисахаридное системное воспаление моделировалось введением липополисахарида (ЛПС), выделенного из микробных клеток сальмонеллы брюшного тифа, в бедренную вену в количестве 200 мкг растворенного 2 мл физиологического раствора. С помощью метода возвратного дыхания гиперкапнически-гипероксической (CO_2–7%, O_2–60%) газовой смесью исследовалось влияние (ЛПС) на вентиляторные ответы при гиперкапнии. Вентиляторная чувствительность определялась с помощью построения кривых роста вентиляции при увеличении парциального давления углекислого газа (PCO_2) в конечной порции выдыхаемого воздуха. Исследование проводилось под общей анестезией с соблюдением основных норм и правил биомедицинской этики (European Community Council Directives 86/609/EEC).

Установлено, что при спокойном дыхании повышение уровня липополисахарида в крови не вызывает достоверных изменений дыхательного объема, минутной вентиляции дыхания. В тоже время внутривенное введение полисахарида оказывает угнетающее влияние на вентиляторную реакцию на гиперкапнию. После введения ЛПС линии тренда становятся более пологими, что свидетельствует о снижении чувствительности регистрируемых параметров (дыхательного объема) к гиперкапнической стимуляции. Отчетливо этот эффект проявлялся через 20 минут действия вещества, через 40 минут был выражен максимально, и через 60 минут начинал снижаться (см. рисунок на стр. 24). Количественные расчеты показали достоверное снижение величины прироста МОД при увеличении PCO_2 на 1 мм рт. ст. на 32%, ДО — на 46% и средней скорости инспираторного потока на 50%, после инъекции липополисахарида ($p<0,01$).

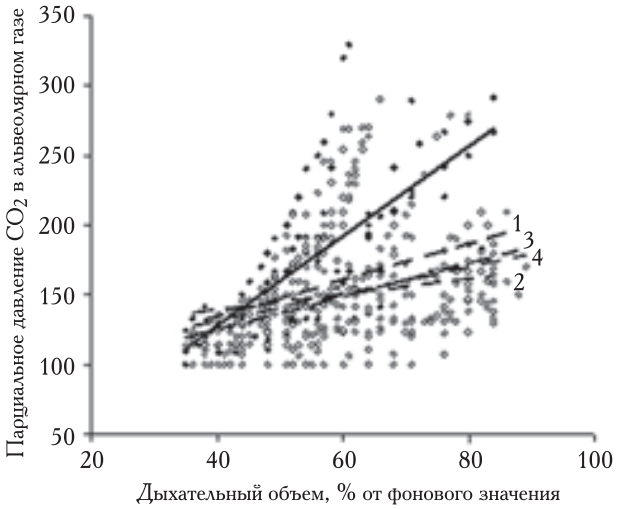


Рисунок. Изменение ДО при возвратном дыхании гипероксически-гиперкапнической газовой смесью при системном введении липополисахарида. Сплошная линия — до введения ЛПС (фон), линии 1, 2, 3, 4 — 20, 40, 60, 90 минут после введения ЛПС соответственно.

Таким образом, наши данные показали, что системное воспаление действительно участвует в центральном хеморецепторном контроле дыхания путем уменьшения хеморефлекторной чувствительности к гиперкапнии.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 15-15-00119.

МОНОАМИНЫ В ГИППОКАМПЕ, ГИПОТАЛАМУСЕ И СТРИАТУМЕ КРЫС ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ И ПСИХОГЕННОМ СТРЕССЕ

Д. В. Крицкая, М. Н. Карпенко, С. Г. Цикунов
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

darya_uladzimirawna@mail.ru

Введение. Стресс — это неспецифическая реакция организма на потребность в адаптации. Причинами стресса могут стать самые разнообразные факторы: психологические и социальные, метаболические, токсические и травматические. Примером психологического стресса является стресс угрозы жизни (витальный), в результате которого более чем у половины людей, переживших катастрофические события природного и техногенного характера, акты агрессии, развивается посттравматическое стрессовое расстройство, моделью такого стресса является сопереживание гибели сородича от действий хищника. Примером метаболического стресса является бактериальное либо вирусное инфицирование, которое может моделироваться введением компонента клеточной стенки мембраны бактерий — липополисахарида. Существующие психологические и фармакологические подходы лечения стресса не всегда достаточно эффективны. До сих пор в фармакологические стандарты лечения последствий стресса не включены препараты, влияющие на содержание моноаминов, ввиду недостаточной изученности вопроса.

Цель исследования: охарактеризовать функциональное состояние моноаминергических систем мозга при метаболическом и психогенном стрессе в гиппокампе, гипоталамусе и стриатуме лабораторных крыс.

Объекты, материалы и методы. Объектами исследования являлись самцы крыс линии Wistar в возрасте 3–4 мес и массой 300–350 г, разделённые на три группы: 1) интактные животные (приученные к рукам; на них не оказывалось никакое стрессорное воздействие) и животные, подвергшиеся 2) метаболическому (однократное интраперитонеальное введение ЛПС в дозе 1 мг/кг веса) и 3) психогенному (сопереживание гибели сородича от действий питона) стрессу. На 1-е, 3-и, 10-е, 50-е сутки после стрессирования для определения содержания моноаминов из мозга 5 крыс обеих экспериментальных групп, и на 1-е и 50-е сутки из мозга 5 крыс интактной группы извлекались гиппокамп, гипоталамус, стриатум. Сроки выбраны для установления эффектов стресса и динамики развития его последствий. Определение содержание норадреналина, дофамина, 3,4-диоксифенилуксусной кислоты и гомованилиновой кислоты проводилось с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией.

Результаты и их обсуждение. При обоих типах стрессорной нагрузки в гиппокампе и стриатуме на 3-и и 10-е сутки после нанесения стресса содержание норадреналина повышалось более чем в 25 раз. К 50-м суткам содержание норадреналина в этих структурах восстанавливалось. При метаболическом и психогенном стрессе в гиппокампе крыс наблюдалось снижение уровня дофамина при неизменной скорости его метаболизма. К 50-му дню после нанесения стресса содержание дофамина в гиппокампе восстанавливалось. При метаболическом и психогенном стрессе в гипоталамусе крыс уровень дофамина сохранялся неизменным на фоне повышения уровня 3,4-диоксифенилуксусной кислоты после метаболического стресса и его снижения при витальном стрессе, а также повышения уровня гомованилиновой кислоты при обоих типах стресса. К 50-му дню содержание 3,4-диоксифенилуксусной и гомованилиновой кислоты восстанавливалось. В стриатуме крыс при психогенном стрессе уровень дофамина был выше, чем при метаболическом стрессе, за счёт меньшей скорости утилизации этого медиатора. Таким образом, на 1-е, 3-и и 10-е сутки после нанесения обоих типов стресса наблюдались существенные изменения в содержании моноаминов, которые нивелировались к 50-м суткам. При обоих типах стрессорной нагрузки наибольшие изменения наблюдались в норадренергической системе, что является общепризнанным фактом и служит подтверждением наличия стресса. Содержание серотонина после нанесения метаболического стресса в стриатуме на третий день восстанавливалось и не изменялось в остальных случаях, что не противоречит литературным данным, в которых говорится о дефиците серотонинергической системы при депрессиях [1–3]. В исследованных структурах мозга при обоих типах стресса нарушался метаболизм дофамина. При психогенном стрессе отмечалось обратимое повышение дофамина в стриатуме, обратимое нарушение утилизации в гипоталамусе и необратимое снижение в гиппокампе. При метаболическом стрессе отмечалось обратимое снижение дофамина в гиппокампе, нарушение метаболизации в гипоталамусе, сложный характер нарушений в стриатуме. Эти результаты согласуются с литературными данными о вовлеченности дофаминергической системы мозга в реакцию на стресс [2, 4]. Были выявлены различия в реакциях дофаминергической системы стриатума и гипоталамуса для различных типов стрессоров, указывающие на нестереоптипность ответа организма при различных воздействиях. Функционирование серотонинергической системы крыс на 50-е сутки после витального и метаболического стресса не отличалось от крыс контрольной группы; восстанавливалось содержание норадреналина в стриатуме крыс, и дофамина и его метаболитов в гиппокампе. Восстановление дофаминергической системы гипоталамуса к 50-м суткам после нанесения метаболического и психогенного стресса происходило посредством различных метаболических путей. К 50-м суткам после нанесения метаболической травмы скорость утилизации дофамина моноаминоксидазой в стриатуме не восстанавливалась.

Литература

1. *Анискин Д. Б.* Психологический стресс и соматические расстройства // Лечащий врач.— 1998.— № 1.— С. 54–56.
2. *Болдырев А. А, Ещенко Н. Д., Илюха В. А., Кяйвяряйнен Е. И.* Нейрохимия.— М.: Дрофа, 2010.— 400 с.

3. *Узбеков М. Г., Максимова Н. М.* Моноамино-гормональные связи в патогенезе тревожной депрессии // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.— 2015.— Т. 115, № 1, вып. 2.— С. 52–55.

4. *Новоселецкая А. П.* Содержание дофамина и его метаболитов в сыворотке крови больных экземой // Мед. журн.— 2009.— № 2 (28).— С. 90–92.

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОВОЛОКОННЫХ БИОИМПЛАНТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ АХИЛЛОВА СУХОЖИЛИЯ

[1,2,3]М. В. Кузьмин, [1,2,3]И. С. Фадеева, [1,2,3]Д. П. Горбачёв, [4]Т. А. Аббасов, [1,2]А. С.Сенотов, [1,2,3]Р. С. Фадеев, [3]Н. И. Фесенко, [5]А. А. Ольхов, [4]В. В. Гурьев, [1,2,3]В. С. Акатов

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

[2]Научно-производственная компания «Рецептор», Пущино, Россия

[3]Пущинский государственный естественно-научный институт, Россия

[4]Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова, Россия

[5]Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН, Москва, Россия

mix.kuzmi2011@gmail.com

Введение. Проблемы восстановления связок и сухожилий после травм требуют особого внимания со стороны научного биомедицинского сообщества. В нормальных условиях связки и сухожилия человека постоянно выдерживают значительные механические нагрузки, однако имеют слабую регенеративную способность [1]. В настоящее время при восстановлении связок и сухожилий широко используются различные имплантаты [2]. Известно, что идеальные имплантаты должны способствовать регенерации поврежденной соединительной ткани и обеспечивать при этом восстановление кинематической функции в максимально сжатые сроки. Однако при использовании синтетических нерезорбируемых материалов зачастую происходит дегенерация здоровой костной, хрящевой или мышечной ткани, т. е. в местах непосредственного крепления имплантатов. Коллективом предложена концепция условно биомиметической (по архитектонике внеклеточного костного матрикса) модели имплантатов сухожилий, полученных с использованием нановолоконных матов на основе ПГБ, закрепленных на опорных биорезорбируемых нитях для создания линии напряжения [3].

Цель исследования: оценка эффективности регенерации ахиллова сухожилия на нановолоконном имплантате на основе поли-3-гидроксибутирата (ПГБ).

Объекты, материалы и методы. В работе использован ПГБ с молекулярной массой 460 кДа (Biomer, Германия), полученный методом электроспиннинга. Исследования регенерационного потенциала разрабатываемых сухожильных имплантатов проводили на модели ортотопической имплантации в область тотального 1,5–2-сантиметрового дефекта ахиллова сухожилия у крыс линии Wistar (самцы, 180–200 г, условия содержания: *ad libitum*). В эксперименте дефект ахиллова сухожилия, создаваемый иссечением сухожилия от икроножной мышцы до пяточного бугра, восполняли имплантатом из нановолокон ПГБ, фиксированных на двух полиамидных нитях. Фиксация имплантата осуществлялась путем крепления мононитей к икроножной мышце и к пяточному бугру классическим хирургическим швом. В контрольной группе дефект ахиллова сухожилия замещали только двумя полиамидными мононитями без ПГБ-волокон. Эксплантацию материала выполняли на сроках 2, 6 и 13 нед имплантации. Для всех экспериментов количество повторов — не менее шести ($n \geqslant 6$). Анализ результатов осуществляли с помощью визуальной оценки использования прооперированных конечностей крысами на всех сроках наблюдения, и с помощью комплексного макро- и микроскопического анализа тотальных препаратов и криосрезов образцов флуоресцентной микроскопии и результатов измерения минерализованного кальция методом адсорбционной спектроскопии.

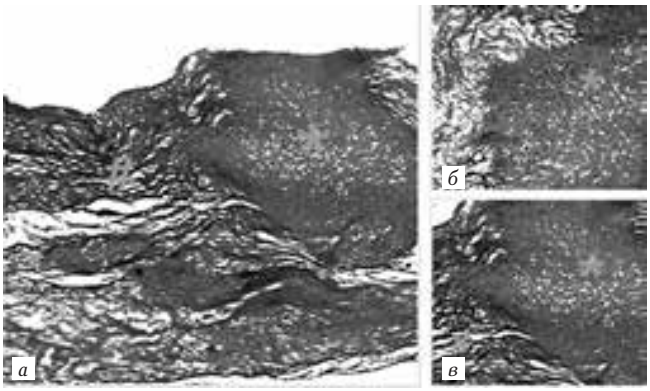


Рисунок. Увеличенные фрагменты сухожильно-хрящевого перехода нативного сухожилия (*б*) и регенерата (*а*, *в*), образованного на месте нановолоконного имплантата, через 6 недель имплантации: *а* — фрагмент сухожильно-хрящевого перехода вблизи пяточного бугра; *б* — увеличенный фрагмент сухожильно-хрящевого перехода вблизи пяточного бугра нативного сухожилия; *в* — увеличенный фрагмент сухожильно-хрящевого перехода вблизи пяточного бугра регенерата. Окраска трихром по Лилли. Увеличение ×50.
* — хрящевые/хрящеподобные новообразованные участки;
# — сухожильные участки перехода.

Результаты и их обсуждение. Было обнаружено, что уже через 6 нед имплантации на месте имплантата обра-

зуется сухожильноподобный функциональный регенерат, морфологически неотличимый от нативного ахиллова сухожилия. Принципиальным результатом явился тот факт, что в местах крепления нановолоконных имплантатов формировались полноценные сухожильно-мышечные и сухожильно-хрящевые переходы.

Заключение. Таким образом, после 6 нед имплантации в новообразованном ахилловом сухожилии в основной массе присутствуют зоны, содержащие упорядоченные волокна с организацией, подобной организации нативного сухожилия, что максимально выраженно в местах сужения перед энтезисом, и участки внедрения/новообразования хрящевой ткани, также свойственной нативному сухожилию.

Работа проведена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «ФИМТ» (№ ФИМТ-2014-136), Совета по грантам Президента РФ (№ СП-6867.2013.4, № СП-1519.2015.4), ГЗ ВУЗу (Проект № 768), а также Фонда содействия РМП НТС.

Литература

1. *Грицюк А. А., Середа А. П.* Ахиллово сухожилие. РАЕН, 2010.— 314 с.
2. Регенерационный потенциал нановолоконного сухожильного имплантата из полигидроксибутирата / Ольхов А. А., Склянчук Е. Д., Аббасов Т. А., Акатов В. С., Фадеева И. С., Фадеев Р. С., Фесенко Н. И., Староверова О. В., Гумаргалиева К. З., Филатов Ю. Н., Иорданский А. Л., Гурьев В. В. // Технологии жив. систем.— 2015.— Т. 12, № 2.— С. 3–11.
3. Волокнистые матриксы для тканеинженерных конструкций из поли-3-гидрооксибутирата и его композитов / Староверова О. В., Шушкевич А. М., Кузьмичева Г. М., Ольхов А. А., Воинова В. В., Ольхов А. А., Жаркова И. И., Шайтан К. В., Склянчук Е. Д., Гурьев В. В. // Технологии жив. систем.— 2013.— Т. 10, № 8.— С. 74–79.

РИСК РАЗВИТИЯ ТРОМБОТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИПОТЕРМИИ У КРЫС

Н. А. Лычева, И. И. Шахматов, А. В. Седов, И. И. Ковалева

Алтайский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Барнаул, Россия

natalia.lycheva@yandex.ru

Введение. Непреднамеренная гипотермия выступает в качестве повреждающего фактора, вызывая развитие деструктивных процессов в тканях. Основным компонентом, обеспечивающим развитие полиорганной недостаточности, является система гемостаза. Показано, что выраженность ответной реакции со стороны системы гемостаза зависит от множества факторов, определяющим из которых является уровень температуры тела, достигнутый в ходе гипотермии [1].

Цель: изучить состояние системы гемостаза и микроциркуляторного русла по достижении умеренной и глубокой степеней гипотермии у крыс.

Материалы и методы. Исследования выполнены на 30 крысах-самцах линии Wistar (m=236,0±15,7 г.). Однократная иммерсионная гипотермия моделировалась путем помещения животных, находившихся в индивидуальных клетках, в емкости с водой при температуре воды 5° С, воздуха 7° С. Животные находились в камере до достижения ректальной температуры 27…30° С (умеренная степень гипотермии), и 20…23° С (глубокая степень гипотермии). В качестве контроля выступали животные, находившиеся в индивидуальных клетках в воде температурой 30° С, при температуре воздуха 22° С. Время экспозиции соответствовало времени охлаждения животных опытной группы. У всех животных исследовались показатели тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, а также антикоагулянтная и фибринолитическая активность плазмы, с использованием рутинных методик и интегрального способа — тромбоэластографии. Функциональное состояние микроциркуляторного русла исследовали с помощью лазерной доплеровской флоуметрии. Все показатели определяли после прекращения воздействия. Данные исследований представлены в виде (Me [25%÷75%]), где Me — медиана в выборочной совокупности, [25%÷75%] — 25-й и 75-й перцентиль. Достоверность различий оценивали при помощи непараметрического U критерия Манна-Уитни. Различия считались достоверными при уровне статистической значимости $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Сравнительный анализ показателей системы гемостаза и микроциркуляторного русла, зарегистрированных у контрольных и экспериментальных животных после прекращения воздействия, приведен в таблице на стр. 28. Полученные результаты демонстрировали развитие состояния тромботической готовности сразу по достижении животными умеренной степени гипотермии, но на фоне зарегистрированного вазоспазма риск развития тромботических осложнений в данный период уменьшался. Достижение глубокой степени гипотермии сопровождалось паралитическим расширением сосудов с формированием застойных явлений в микроциркуляторном русле [2], что на фоне снижения концентрации в кровотоке растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) позволяло предположить элиминацию РФМК в сосуды микроциркуляторного русла и формирование полиорганной недостаточности.

Выводы. Риск развития тромботических осложнений увеличивался при достижении глубокой степени гипотермии, что сопровождалось не только гемостазиологическими сдвигами, но и паралитическим расширением сосудов с формированием застойных явлений в микроциркуляторном русле.

Таблица

Показатели системы гемостаза и микроциркуляторного русла по достижении умеренной и глубокой степеней гипотермии

Параметры гемостаза	Контроль	Умеренная гипотермия	Глубокая гипотермия
Количество тромбоцитов, $\times 10^9$/л	511,0 [502,0÷554,0]	588,0 [548,0÷641,0]*	572,0 [552,5÷638,0]*
АДФ-агрегация, макс.знач	6,7 [3,1÷19]	56,0 [33,6÷74,1]**	47,7 [31,6÷72,7]**
Коллаген-агрегация, мак. знач.	10,7 [9,1÷15]	16,2 [13,1÷17,2]*	17,7 [16,1÷19]*
АПТВ, с	15,4 [11÷16]	17,4 [16,3÷26,2]	19,0 [17,3÷23,5]*
Протромбиновое время, с	22,2 [21,8÷23,1]	25,3 [23,3÷28,3]	27,1 [24,7÷28]*
РФМК, мг/100 мл	3,0 [3,0÷3,0]	5,5 [4,5÷5]*	4,5 [4,0÷4,6]*
ВПФМ, г	1,8 [1,6÷2,1]	2 [1,6÷2,1]*	1,7 [1,5÷1,8]
Антитромбин III, %	116,5[114,2÷117,0]	70,0 [47,3÷109,0]*	90,9 [79,2÷126,3]*
Эуглобулиновый фибринолиз, мин	558,0 [360,0÷558,0]	1248,0 [1212÷1248]**	1248,0 [560÷1286,5]**
CT, с	206,0[197,5÷210,5]	224,0[221,0÷240,0]	246,0[213,2÷264,5]*
CFT, с	98,0 [82,0÷118,5]	57,0 [42,0÷68,0]**	72,0[63,0÷117,0]*
ML, %	15,0 [0,0÷20,5]	5,0 [0,0÷12,5]**	0,0 [0,0÷0,0]**
ПМ, пф.ед.	6,6 [4,2÷8,6]	3,1 [2,1÷3,4]*	18,2 [16,3÷21,4]**
ПШ, г	1,09 [1,02÷1,26]	2,1 [1,9÷2,3]*	1,1 [1,05÷1,2]
Кардиальные волны, амп	24,1 [19,6÷29,6]	12,01 [7,5÷17,2]**	37,8 [33,5÷39,4]
Дыхательные волны, амп	47,83 [37,4÷57,9]	40,1 [37,6÷47,2]*	66,2 [60,3÷70,3]**

Примечание: Обозначены статистически значимые отличия от соответствующих показателей: * — при $p<0,05$; ** — при $p<0,01$.
АПТВ — активированное парциальное тромбопластиновое время; РФМК — растворимые фибрин-мономерные комплексы, ВПФМ — время полимеризации фибрин-мономерных комплексов, ПМ — показатель микроциркуляции, ПШ — показатель шунтирования, CT — время коагуляции, CFT — время формирования сгустка, ML — максимальный лизис.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60054\15 мол_а_дк.

Литература

1. *Gong P., Zhang M. Y., Zhao H. et al.* Effect of hypothermia on the coagulation-fibrinolysis system and physiological anticoagulants after cardiopulmonary resuscitation in a porcine model // Int. J. Clin. Exp. Med.— 2013.— Vol. 8.— P. 16–21.
2. *Бархатов И. В.* Применение лазерной допплеровской флоуметрии для оценки нарушений системы микроциркуляции крови человека // Казанский медицинский журнал.— 2014.— Т. 95, № 1.— С. 63–69.

СОСТОЯНИЕ МЕТАБОЛИЗМА NO В КРОВИ ДЕТЕЙ С ПАТОЛОГИЕЙ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

А. К. Мартусевич, К. В. Киреева, О. В. Шумилова, Э. Н. Федулова
Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр Министерства здравоохранения РФ, Нижний Новгород, Россия

cryst-mart@yandex.ru

Введение. Результаты проводимых в последние десятилетия экспериментальных и клинических исследований указывают на важную роль оксида азота (NO) в патогенезе различных заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1, 2]. Отмечена роль данного соединения как цитопротектора слизистой оболочки ЖКТ [1]. В то же время известно и о повреждающих эффектах NO, преимущественно опосредуемых через образование пероксинитрита [1–3]. В полной мере эти противоречивые сведения относятся и к педиатрической практике, в связи с чем актуальным является изучение роли NO в патогенезе гастроэнтерологических заболеваний у детей.

Цель работы: уточнение роли NO-зависимого компонента в механизмах развития гастроэнтерологических заболеваний у детей.

Испытуемые, материалы и методы. В исследование было включено 178 детей, из которых 40 являлись практически здоровыми (группа сравнения), 72 ребенка имели болезнь Крона (БК; основная группа — 1), 31 — хронический гастродуоденит (ГД; основная группа — 2), 35 — гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь (ГЭРБ; основ-

Таблица

Уровень конечных метаболитов NO у здоровых и имеющих гастроэнтерологическую патологию детей (Me [Q1-Q3])

Параметр	Группа			
	Здоровые дети	Дети с ГД	Дети с ГЭРБ	Дети с БК
Общие метаболиты, мкмоль/л	23,5 [17,6–27,8]	31,3 [25,0–43,1]*	43,5 [25,8–53,7]*	37,4 [28,4–51,1]*
Нитриты, мкмоль/л	7,8 [6,8–8,5]	11,0 [6,7–14,8]*	13,0 [8,6–16,8]*	7,7 [5,1–11,4]
Нитраты, мкмоль/л	15,1 [10,7–18,4]	21,5 [17,2–25,8]*	29,5 [22,91–37,8]*	29,8 [18,0–42,9]*

Примечание. * — Статистическая значимость различий по отношению к здоровым детям; $p<0,05$.

ная группа — 3). Работа одобрена Этическим комитетом ФГБУ «ПФМИЦ» МЗ РФ; законные представители пациентов (поскольку пациенты — дети) подписывали информированное согласие на участие в исследовании. У всех детей производили получение образцов крови для оценки суммарного уровня конечных продуктов метаболизма NO, а также концентрации нитрит- и нитрат-анионов в сыворотке крови. Определение производных NO проводили колориметрическим методом с использованием реактива Грисса по методике Метельской В. А. [4]. Полученные данные были обработаны статистически в программном пакете Statistica 6.0, США.

Результаты и их обсуждение. На основании проведенных исследований установлено, что, как по концентрации основных конечных продуктов метаболизма NO в сыворотке крови детей, так и по суммарному количеству таких метаболитов, имеют место отличия между здоровыми и страдающими заболеваниями ЖКТ детьми (таблица).

При этом общей тенденцией изменения изучаемых параметров является их нарастание, однако выраженность этих сдвигов неодинакова. Наиболее существенное увеличение уровня конечных метаболитов NO зарегистрировано при ГЭРБ: отмечено практически двукратное пропорциональное повышение концентраций нитрат- и нитрит-ионов, а также их суммарного уровня. Помимо этого, пропорциональные, но менее значительные (увеличение в 1,33–1,42 раза) сдвиги указанных показателей выявлены у детей с ГД, что может косвенно свидетельствовать о менее выраженной стимуляции продукции/высвобождения из депонирующих соединений NO при этой патологии, по сравнению с ГЭРБ. Особая динамика уровня конечных метаболитов NO обнаружена при БК. В этом случае происходит существенное нарастание суммарной их концентрации, статистически значимо превышающее выявленное при гастродуодените ($p<0,05$), причем оно реализуется исключительно за счет резкого (1,97 раза; $p<0,001$) повышения количества нитрат-ионов в сыворотке крови детей. Подобная картина может быть обусловлена параллельным формированием у них окислительного стресса с быстрым нарастанием концентраций активных форм кислорода в сыворотке крови и усилением сопряженности метаболизма последних и NO [1, 3]. Это может сопровождаться индукцией свободнорадикальных процессов с превалирующей трансформацией избытка NO именно в нитрат-анионы [1, 2].

Заключение. Наши исследования позволили подтвердить наличие значимых сдвигов метаболизма NO в сыворотке крови детей с заболеваниями ЖКТ, притом что такие сдвиги могут носить специфический характер, отражая особенности патогенеза конкретной патологии. Следовательно, оценка состояния других звеньев метаболизма NO при рассматриваемых заболеваниях способна существенно дополнить их патогенетическую картину.

Литература

1. *Костюк В. А., Потапович А. И.* Биорадикалы и биоантиоксиданты.— Минск: БГУ, 2004.
2. *Kalyanaraman B.* Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms // Redox Biol.— 2013.— № 1.— P. 244–257.
3. *Мартусевич А. К., Перетягин С. П., Соловьева А. Г., Ванин А. Ф.* Оценка некоторых молекулярных эффектов газообразного оксида азота на кровь человека *in vitro* // Биофизика.— 2013.— Т. 58, № 5.— С. 871–875.
4. *Метельская В. А., Гуманова Н. Г.* Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови // Клин. лаб. диагностика.— 2005.— № 6.— С. 15–18.

ВЛИЯНИЕ ИЗОЛИРОВАННОГО И СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕКСИДОЛА И ГИПОКСИИ НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА У КРЫС В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

С. В. Москаленко

Алтайский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Барнаул, Россия

rector@agmu.ru

Введение. Гипоксия может иметь самостоятельную этиологию, однако может выступать и в качестве сопутствующего фактора при заболеваниях, связанных с нарушением функции систем организма, усугубляя

Таблица

Показатели системы гемостаза плазмы крови крыс после изолированного и сочетанного воздействий гипоксии и мексидола (m [25%ч75%])

Показатели	Ежедневное 30-кратное тренировочное воздействие + гипоксическая гипоксия (1 ч – 8000 м) на 31-й день		
	Гипоксия (1 ч – 7000 м)	Мексидол (50 мг/кг)	Гипоксия (1 ч – 7000 м) + Мексидол (50 мг/кг)
Тромбоциты, $\times 10^9$/л	540,0 [532,0÷554,0]*** (Δ+12%)	558,0 [536,8÷589,0]*** (Δ-7%)	517,5 [513,5÷524,5]
Индуцированная АДФ-агрегация тромбоцитов, макс. значение	36,5 [31,3÷38,9]*** (Δ+47%)	20,1 [19,4÷24,3]	18,4 [17,9÷23,1]
Индуцированная коллаген-агрегация тромбоцитов, макс. значение	18,7 [17,7÷21,1]** (Δ+34%)	16,3 [15,2÷17,0]	15,8 [14,3÷17,3]
АПТВ, с	17,4 [16,7÷18,3]** (Δ+9%)	14,8 [14,2÷15,6]** (Δ-9%)	16,7 [16,5÷17,7]
Протромбиновое время, с	32,0 [30,5÷36,8]* (Δ+10%)	31,2 [30,1÷33,0]*** (Δ+11%)	29,2 [28,0÷30,6]
Тромбиновое время, с	41,8 [39,3÷46,4]	40,8 [38,2÷41,4]*** (Δ+25%)	35,7 [35,0÷37,6]*** (Δ+21%)
ВПФМ, с	71,6 [67,7÷74,9]*** (Δ+43%)	71,6 [65,0÷76,5]*** (Δ+24%)	51,6 [50,5÷53,4]
Фибриноген, г/л	2,0 [1,8÷2,3]** (Δ+25%)	1,4 [1,2÷1,5]*** (Δ-33%)	2,3 [2,1÷2,3]
РФМК, мг/100 мл	3,0 [3,0÷3,6]*** (Δ-56%)	3,0 [3,0÷3,0]** (Δ-25%)	4,0 [3,0÷4,0]
Антитромбин III, %	117,5 [113,8÷124,3]*** (Δ+34%)	89,0 [88,0÷91,0]** (Δ-11%)	99,0 [95,0÷101,5]
Антитромбиновый резерв плазмы, %	104,5 [94,3÷107,5]	94,8 [93,4÷97,9]*** (Δ-11%)	134,5 [130,9÷144,5]** (Δ+17%)
Спонтанный эуглобулиновый фибринолиз, мин	585,0 [570,0÷660,0]* (Δ-19%)	360,0 [345,0÷375,0]*** (Δ-40%)	590,0 [540,0÷630,0]

Примечание: Обозначены статистически значимые отличия от соответствующих показателей группы контроля: * — при $p<0,05$; ** — при $p<0,01$; *** — при $p<0,001$; Δ (%) — статистически значимые изменения величин показателей относительно величин в контроле (в процентах). АПТВ — активированное парциальное тромбопластиновое время; ВПФМ — время полимеризации растворимых фибрин-мономерных комплексов; РФМК — растворимые фибрин-мономерные комплексы.

их течение [1]. Перспективным путем решения проблемы повышения устойчивости к гипоксии, помимо тренировок, является использование фармакологической коррекции, а именно применение антигипоксантов, обладающих антиоксидантной, мембранопротекторной, антигипоксической и антистрессорной активностью, а также вазо- и реопротекторным действием [2].

Цель: изучить адаптационные реакции системы гемостаза у крыс на изолированное и сочетанное воздействие гипоксической гипоксии и мексидола в хроническом эксперименте.

Материалы и методы. Исследования были выполнены на 60 крысах-самцах линии Wistar (m=236±34 г). 1-я опытная группа подвергалась 30-кратному ежедневному воздействию гипоксии «сильной» интенсивности (7000 м) в течение 1 ч, 1-я контрольная группа — 30-кратное воздействие нормоксии в барокамере (1 ч); 2-я опытная группа — 30-кратное ежедневное введение мексидола (50 мг/кг), 2-я контрольная группа — 30-кратное введение 0,9% раствора NaCl (50 мг/кг); 3-я опытная группа — 30-кратное воздействие гипоксии в течение 1 ч — 7000 м и введение мексидола (50 мг/кг), 3-я контрольная группа — 30-кратное воздействие нормоксии в барокамере (1 ч) и введение 0,9% раствора NaCl (50 мг/кг). После окончания циклов тренировочных режимов в опытных и контрольных группах проводилось экспериментальное воздействие — однократная гипоксия «тяжелой» интенсивности в течение 1 ч — 8000 м. Забор крови у животных осуществлялся под эфирным наркозом, кровь для исследования забирали из печеночного синуса в объеме 5 мл. Данные исследований представлены в виде m [25%÷75%], где m — медиана в выборочной совокупности, [25%÷75%] — 25-й и 75-й перцентиль [5]. Достоверность различий оценивали при помощи непараметрического U критерия Манна-Уитни. Различия считались достоверными при уровне статистической значимости $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Сравнительный анализ результатов исследования показателей системы гемостаза, зарегистрированных после изолированного и сочетанного воздействий гипоксии и мексидола, приведен в таблице (см. таблицу на стр. 30). Полученные результаты позволяют предположить, что комбинированное воздействие гипоксии «сильной» интенсивности и мексидола (по сравнению с раздельным влиянием гипоксии или антигипоксантом) повышает устойчивость экспериментальных животных к острой гипоксии «тяжелой» интенсивности на основании отсутствия признаков тромбинемии. Из вышеизложенного можно сделать вывод, что состояние системы гемостаза характеризуется полноценным восстановлением параметров и развитием адаптации к данному виду стрессора. Полученные результаты могут быть использованы при разработке методов неспецифической антигипоксической защиты тканей организма.

Литература

1. *Макаренко А. Н., Карандеева Ю. К.* Адаптация к гипоксии как защитный механизм при патологических состояниях // Вестник проблем биологии и медицины.— 2013.— № 2 (100).— С. 27–33.
2. *Стратиенко Е. Н., Петухова Н. Ф.* Поиск средств фармакологической коррекции гипоксических состояний // Вестник Брянского государственного университета.— 2012.— № 4 (2).— С. 232–234.

ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С ЭССЕНЦИАЛЬНЫМ ТРЕМОРОМ

З. М. Муружева, Е. А. Скоморохова, М. Н. Карпенко
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

zamira.muruzheva@mail.ru

Эссенциальный тремор (ЭТ) — наиболее часто встречаемое наследственное экстрапирамидное расстройство нервной системы. Заболевание носит относительно доброкачественный характер и отличается медленно прогрессирующим постурально-кинетическим тремором рук с частотой 4–12 Гц, реже — тремором головы, губ, голоса, туловища, ног, а в некоторых случаях сопровождается другими моторными и немоторными проявлениями. Распространенность ЭТ составляет около 4% среди лиц в возрасте 40 лет и увеличивается с возрастом, достигая 21,7% в возрасте 95 лет и старше [1]. Патоморфологические исследования последнего десятилетия указывают на нейродегенеративный характер поражений, выявляемых при ЭТ, таких как церебеллярная дегенерация и наличии телец Леви в стволе мозга [2]. Существуют доказательства того, что одним из патофизиологических факторов, инициирующих нейродегенеративный процесс, является окислительный стресс. В физиологических условиях реактивные формы кислорода и азота «уравновешиваются» антиоксидантами. Однако повышение уровня свободных радикалов и снижение антиоксидантной защиты может привести к повреждению липидов, белков и ДНК и, как следствие, к гибели клетки [3].

В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования было определить уровень супероксиддисмутазы (СОД) и малонового диальдегида (МДА) в периферической крови пациентов с ЭТ.

Материалы и методы. Обследовано 20 больных с ЭТ, в возрасте от 22 до 81 лет. Диагноз ставился с использованием критериев Tremor Investigation Group (1995). У 9 пациентов наблюдался тремор головы и рук, у 11 пациентов преимущественно тремор рук. В исследование включались пациенты, не имеющие признаков острой фазы воспалительного процесса. Группу контроля составили 20 клинически здоровых лиц. В сыворотке

крови пациентов с ЭТ и у контрольной группы была измерена концентрация СОД и МДА колориметрическими методами.

Результаты. Оказалось, что в контрольной группе антиоксидантная активность (АА) СОД крови в реакции с квертицином составила (37,0±3,6) усл. ед.; в группе пациентов с ЭТ — (30,3±3,6) усл. ед., p=0,20. Следовательно, активность СОД в контрольной и экспериментальной группах не отличалась. Уровень МДА, отражающий интенсификацию процессов перекисного окисления липидов, составил в контрольной группе (1,20±0,03) мкмоль/л; в группе с ЭТ — (1,38±0,09) мкмоль/л, p=0,09 и также не отличался в обеих группах.

При разделении пациентов с ЭТ по преобладанию дрожания оказалось, что в группе с преобладающим тремором рук АА СОД крови составил (28,4±2,9) усл. ед., p=0,05 по сравнению с контролем; у пациентов с преобладающим тремором головы АА СОД крови составил (31,0±6,6) усл.ед., и не отличался от контроля. Уровень МДА в группах также различался: у пациентов с преимущественным тремором головы он составил (1,40±0,08) мкмоль/л, p=0,005 по сравнению с контролем и p=0,09 по сравнению с пациентами с преобладающим тремором рук, у которых уровень МДА составил (1,20±0,04) мкмоль/л и не отличался от контрольной группы.

Разделив пациентов по длительности заболевания, мы обнаружили снижение АА СОД крови до (22,9±4,8) усл.ед. у пациентов с длительностью заболевания до 7 лет, p=0,041 по сравнению с контролем. Однако у пациентов с длительность заболевания более 15 лет АА СОД крови не отличался от контроля и составил (35,0±4,6) усл.ед., p=0,734. По уровню МДА различий в группах выявлено не было. У пациентов с длительностью заболевания до 7 лет он составил (1,32±0,07) мкмоль/л, у пациентов с длительностью заболевания более 15 лет — (1,25±0,07) мкмоль/л и не отличался от контроля.

Выводы

1. Отличия показателей СОД и МДА у пациентов с различными клиническими проявлениями могут свидетельствовать в пользу гетерогенности патогенеза ЭТ.

2. Зависимость процента ингибирования СОД в крови от длительности заболевания свидетельствует в пользу вовлечения СОД в формирование адаптивного потенциала у пациентов с ЭТ.

Литература

1. *Louis E. D.* Environmental epidemiology of essential tremor // Neuroepidemiology.— 2008.— Т. 31, №. 3.— С. 139–149.
2. *Louis E. D.* Essential tremor: from bedside to bench and back to bedside // Current opinion in neurology.— 2014.— Т. 27, № 4.— С. 461.
3. *Васенина Е. Е., Левин О. С.* Окислительный стресс в патогенезе нейродегенеративных заболеваний: возможности терапии // Современная терапия в психиатрии и неврологии.— 2013.— № 3–4.

ПРИЗНАКИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ У КРЫС С МАРГАНЦЕВОЙ ТОКСИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ

[1,2]И. С. Обламская, [1,2]Н. С. Пестерева, [1]Е. А. Скомарохова, [1,2]М. Н. Карпенко
[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия

i.s.oblamskaya@mail.ru.

Актуальность научной проблемы. Марганец (Mn) — элемент побочной подгруппы VII группы 4 периода Периодической системы с атомным номером 25. Присутствует в воде, в продуктах питания, в витаминных комплексах. Марганец входит в состав активного центра многих ферментов, однако, при неконтролируемом поступлении марганца в организм в количествах, превышающих нормы ВОЗ, возможны отравления [1]. Избыточное накопление марганца в организме сказывается, в первую очередь, на функционировании центральной нервной системы (ЦНС). Токсическая доза для человека составляет 40 мг марганца в день [1]. Накопление марганца в клетках ЦНС приводит к появлению симптомов, напоминающих симптомы болезни Паркинсона [2]. Это объясняется тем, что в первую очередь при марганцевой интоксикации страдают нейроны черной субстанции и бледного шара из-за окисления дофамина до аминохрома [3]. Выбор лечения данной формы патологии в настоящее время ограничен препаратами леводопы и ЭДТА. В обоих случаях наблюдается ограниченный и неустойчивый терапевтический эффект. До сих пор остается непонятно, за счет каких механизмов обеспечивается нейротоксический эффект солей марганца. Основной гипотезой является предположение об инициации в ответ на накопление марганца клетками неконтролируемого воспалительного процесса в ЦНС с лавинообразной самоподдерживающейся активацией микроглиальных клеток и астроцитов. Действительно, марганец через высоко-аффинные транспортные механизмы железа проходит через ГЭБ и накапливается в астроцитах (его содержание в 50 раз больше, чем в нейронах). Марганец накапливается преимущественно в митохондриях и разрушает энергетический метаболизм астроцитов. Он может быть токсичен и для самих астроцитов, которые важны для его транспорта и накопления в мозге.

Чрезмерная активация астроцитов и микроглии может привести к избыточному выделению и аккумуляции токсического уровня активных форм кислорода, активных форм азота и цитокинов, которые, в свою очередь, могут активировать близлежащие глиальные клетки, тем самым, замыкая цикл, приводящий к смерти нервных клеток [4].

Активированные микроглиальные клетки секретируют в межклеточную жидкость различные воспалительные агенты (хемокины, цитокины) и, как стало недавно известно, некоторые внутриклеточные протеазы, например, кальпаин [5]. Кальпаины — это Ca^{2+} — зависимая система внутриклеточных протеаз, чрезмерная активация которой, вызванная увеличением концентрации внутриклеточного кальция, приводит к нарушению регуляции многих физиологических функций организма [5].

Цель представляемой работы: определение возможных механизмов и факторов, участвующих в развитии марганец-опосредованного нейровоспаления при хронической интоксикации ионами марганца лабораторных крыс, получавших хлорид марганца интраназально.

Используемые методы и подходы. В данной работе были использованы взрослые самцы крыс линии Вистар, массой 220–250 г. Экспериментальная группа крыс получала интраназально хлорида марганца в концентрации 50 мг/мл, в течение 10 недель. Контрольные животные получали тот же объем инъекций физиологического раствора. Далее при помощи методов атомно-абсорбционной спектроскопии были измерены уровни марганца в различных отделах мозга: обонятельных луковицах, гиппокампе и стриатуме. Используя ПЦР в реальном времени, были измерены уровни мРНК некоторых цитокинов и протеаз. Уровень СОД определяли стандартным колориметрическим методом с использованием квертицина.

Результаты. Оказалось, что уровень марганца значительно выше у опытной группы крыс по сравнению с контрольной (в 2 раза в обонятельных луковицах, височных долях, гиппокампе и в 4 раза в стриатуме). В крови же уровень марганца не изменился. Тем не менее, в экспериментальной группе мы обнаружили зависимое от времени понижение уровня СОД в крови животных, что указывает на наличие воспалительного процесса. Также, судя по нашим данным, продолжительное воздействие высоких доз марганца приводит к увеличению экспрессии уровня мРНК ИЛ-1β и ФНО-α в стриатуме в 2,5 раза. Было показано увеличение экспрессии уровня мРНК IBA-1 в 5 раз, что также указывает на наличие нейровоспаления. Мы обнаружили примерно 10-кратное увеличение уровня NFκB, уровней активности m-/μ-кальпаинов и их мРНК в стриатуме крыс с экспериментальной марганцевой энцефалопатией, что указывает на нейродегенерацию. В гиппокампе данных изменений обнаружено не было.

Литература

1. *Калинникова Т. Б., Тарасов О. Ю., Колсанова Р. Р., Гайнутдинов М. Х.* О нейротоксичности марганца в питьевой воде из подземных источников // Научно-технический журнал Георесурсы.— 2011.— № 5 (41).— С. 31–34.
2. *Michalke B., Fernsebner K.* New insights into manganese toxicity and speciation // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.— 2013.— Vol. 28 2.— P. 235–246.
3. *Sistrunk S. C., Ross M. K., Filipov N. M.* Direct effects of manganese compounds on dopamine and its metabolite Dopac: an in vitro study // Environ Toxicol Pharmacol.— 2007 May.— Vol. 23 (3).— P. 286–296.
4. *Filipov N. M., Dodd C. A.* Role of glial cells in manganese neurotoxicity // J. Appl. Toxicol.— 2011.— Vol. 32.— P. 310–317.
5. *Levesque S., Wilson B., Gregoria V., Thorpe L. B, Dallas S., Polikov V. S., Jau-Shyong Hong, Block M. L.* Reactive microgliosis: extracelluar μ-calpain and microglia-mediated dopaminergic neurotoxicity // Brain.— 2010.— Vol. 133.— P. 808–821.

ОРЕКСИН А В НЕЙРОНАХ ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ АНТИГЕНОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

В. А. Пугач

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

glandula_pinealis@mail.ru

Орексин А — гипоталамический нейропептид, который вовлекается в регуляцию многих физиологических процессов, в том числе таких как пищевое поведение, терморегуляция, цикл сон/бодрствование, болевое восприятие, локомоторная активность [1]. Известно, что изменения этих процессов возникают при развитии продромального синдрома, развивающегося в ответ на различные антигенные стимулы. Существуют литературные данные, свидетельствующие о том, что липополисахарид (ЛПС) и бычий сывороточный альбумин (БСА) вызывают активацию гипоталамических структур, паттерн которой различен [2]. В связи с этим, становится актуальным вопрос о степени вовлечения орексин-А-содержащих нейронов, локализованных в различных структурах гипоталамуса, в механизмы реализации реакций мозга на введение антигенов различной природы.

Целью работы явилось изучение реакции гипоталамических нейронов, содержащих орексин А, на введение ЛПС и БСА.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 120 крысах, взрослых самцах породы Wistar, весом 200–250 гр. Экспериментальные группы: интактные животные; животные после введения ЛПС (*E.coli* 055:B5, «Sigma», L2880, 500 мкг/кг); животные после введения БСА («Sigma», 25 мг/кг); животные после введения физиологического раствора (контроль). Все растворы вводили внутривенно (*v. caudalis*) в объеме 200 мкл. Визуализацию орексин-А-позитивных нейронов проводили после интракардиальной перфузии на замороженных срезах (30 мкм) авидин-биотиновым методом. Выявление орексин-А-позитивных нейронов осуществляли при 10-кратном увеличении светового микроскопа на срезах, соответствую-

Таблица

Относительная оптическая плотность орексин-А-позитивных нейронов в структурах гипоталамуса, локализованных на срезах 28 уровня мозга

Структуры гипоталамуса	ООП орексин-А-позитивных нейронов у животных:			
	Интактных	после введения:		
		физиологического раствора	ЛПС	БСА
		через 1 час		
DMH	1,479±0,071	1,486±0,05	1,304±0,063*	1,23±0,052*
LHAjd	1,493±0,082	1,438±0,06	1,29±0,052*	1,266±0,04*
LHAs	1,497±0,094	1,503±0,073	1,314±0,064*	1,284±0,064*
LHAd	1,561±0,093	1,52±0,071	1,278±0,06*	1,259±0,08*
		через 2 часа		
DMH	1,523±0,064	1,496±0,085	1,214±0,072*	1,25±0,051*
LHAjd	1,552±0,069	1,446±0,07	1,243±0,059*	1,243±0,09*
LHAs	1,547±0,085	1,492±0,054	1,288±0,054*	1,254±0,062*
LHAd	1,532±0,075	1,444±0,08	1,272±0,054*	1,22±0,044*
		через 4 часа		
DMH	1,549±0,056	1,523±0,082	1,221±0,074*	1,286±0,054*
LHAjd	1,573±0,072	1,488±0,079	1,23±0,06*	1,25±0,052*
LHAs	1,525±0,073	1,514±0,055	1,268±0,075*	1,258±0,066*
LHAd	1,509±0,084	1,488±0,091	1,25±0,065*	1,2±0,063*
		через 6 часов		
DMH	1,551±0,095	1,556±0,078	1,192±0,06*	1,244±0,06*
LHAjd	1,546±0,085	1,52±0,094	1,184 ±0,061*	1,224±0,063*
LHAs	1,551±0,088	1,556±0,067	1,236±0,076*	1,258±0,061*
LHAd	1,552±0,091	1,496±0,096	1,214±0,072*	1,226±0,063*

* — P<0,05 по сравнению с ООП орексин-А-позитивных нейронов у животных после введения физиологического раствора.

щих 28 уровню головного мозга (Swanson L. W., 2004), поскольку именно на этом уровне локализовано наибольшее количество клеток, содержащих орексин А. Подсчет количества нейронов, содержащих орексин А, а также определение относительной оптической плотности (ООП) их окраски осуществляли при помощи компьютерной программы VideoTestMaster в дорсомедиальном ядре гипоталамуса (DMH) и в зонах латеральной гипоталамической области (LHA): юкстадорсомедиальной (LHAjd), супрафорникальной (LHAs), дорсальной (LHAd) и в медиальной зоне вентральной области LHA (LHAvm). ООП рассчитывали по следующей формуле: ООП=средняя опт.плотность нейронов / средняя опт.плотность фона. Постановку количественной полимеразно-цепной реакции (qPCR) выполняли с целью исследования уровня экспрессии гена — предшественника орексина А (препроорексин, PPO). Статистический анализ данных проводили в программе «Statistica 8.0». Определяли средние значения и их стандартные ошибки, для сравнения средних значений использовали t-критерий Стьюдента, за достоверные принимали значения, при которых p<0,05.

Результаты. На срезах мозга, соответствующих 28 уровню выявлено увеличение числа орексин-А-иммунореактивных клеток в LHAs (54,63±3,02 vs 37,06±2,63) через 1 час после инъекции ЛПС. Через 2 и 4 часа изменения обнаружены не были. Через 6 часов после введения ЛПС констатировано снижение количества нейронов, содержащих орексин А, в LHAjd (30,34±2,81 vs 40,1±3,12) и LHAs (33,63±3,59 vs 49,2±3,79). Инъекция БСА приводит также к снижению числа исследуемых иммунопозитивных нейронов в LHAjd (28,38±2,98 vs 40,1±3,12) и LHAs (32,39±2,32 vs 49,2±3,79) через 6 часов после инъекции. Аппликация ЛПС и БСА сопровождалась уменьшением ООП орексин-А-позитивных нейронов во всех структурах и на всех исследуемых сроках (таблица). Введение ЛПС сопровождалось увеличением интенсивности экспрессии гена PPO через 2 часа (0,0531±0,0034 vs 0,0229±0,0039) и снижением — через 6 часов (0,0152±0,0029 vs 0,0278±0,0022) после воздействия. Инъекция БСА не оказывала влияния на интенсивность экспрессии исследуемого гена.

Заключение. Нейроны гипоталамуса, содержащие орексин А, участвуют в реализации реакций ЦНС на введение ЛПС и БСА, а степень активации этих нейронов зависит от природы применяемого антигена. Популяция орексин-А-содержащих нейронов функционально гетерогенна, о чем свидетельствует изменение содержания орексина А в нейронах, локализованных в различных гипоталамических структурах.

Литература

1. *Kukkonen J. P.* Physiology of the orexinergic/hypocretinergic system: a revisit in 2012 // Am J Physiol Cell Physiol.— 2013.— Vol. 304.— P. 2–32.
2. *Перекрест С. В., Гаврилов Ю. В., Абрамова Т. В., Новикова Н. С., Корнева Е. А.* Активация клеток гипоталамических структур при введении антигенов различной природы (по экспрессии c-fos гена) // Медицинская иммунология.— 2006.— Т. 8, № 5–6.— С. 631–636.

РАЗРАБОТКА ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ С ВЫСОКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ БИОИНТЕГРАЦИИ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

[1,2]А. С. Сенотов, [1,2,3]И. С. Фадеева, [1,2]П. О. Кирсанова, [1,2,3]Р. С. Фадеев, [2,4]А. А. Просвирин, [3]Н. И. Фесенко, [2,5]М. В. Лекишвили, [1,2,3]В. С. Акатов

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
[2]Научно-производственная компания «Рецептор», Пущино, Россия
[3]Пущинский государственный естественно-научный институт, Россия
[4]Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова, Россия
[5]Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

a.s.senotov@gmail.com

Введение. Создание технологий получения высокобиосовместимых и остеокондуктивных материалов по-прежнему является актуальной и востребованной задачей в современной травматологии, ортопедии и челюстно-лицевой хирургии [1].

Цель исследования: разработка эффективных способов предимплантационной обработки донорской костной ткани (ДКТ) ксеногенного происхождения (половозрелые быки, губчатая кость), обеспечивающих подавление иммуногенности, щадящую делипидизацию и деминерализацию, повышение регенеративного потенциала и достоверного обеспечения биоинтеграции в организме реципиента [2].

Материалы и методы. По итогам ранее проведенных экспериментов выбран максимально перспективный экспериментальный протокол обработки ДКТ с целью выявления степени биосовместимости *in vitro* и эффективности его применения в модели гетеротопической имплантации мелким лабораторным животным *in vivo*. Для оценки цитотоксического действия биоматериалов использовался стандартный метод культуры клеток *in vitro*. Определение количества живых и погибших клеток через 4, 24, 48 и 96 ч после посева (линия L929) проводили при помощи двойного люминесцентного окрашивания (Hoechst 33342, пропидия йодид) с использованием конфокального микроскопа Leica TCS SP5. Оценка эффективности разработанного протокола очистки донорского материала по критериям международных стандартов (ISO10993 и 510(k) Memorandum — #G95–1) осуществлялась на модели гетеротопической имплантации полученных материалов крысам (самцы линии Wistar, масса 180–200 г, условия содержания: *ad libitum*) на сроках 2, 6 и 13 нед имплантации. После выведения животных из эксперимента проводили макроскопическую оценку и гистологический анализ криосрезов экспериментальных образцов (гематоксилин — эозин, дифференциальные окраски по Голднеру, Ван Гизону, МакГи-Расселу); получение гистотопограмм осуществлялось при помощи микроскопа Nikon Ti-E и компьютерной программы NIS-Elements (производитель аппаратного и программного обеспечения — Nikon, Япония). Достоверность отличия выборок экспериментальных данных, а также средних значений оценивали с помощью критерия Уитни–Манна для независимых выборок. Эксперименты проводились не менее чем в шести ($n \geqslant 6$; подсчет количества живых и погибших клеток в материалах) или трех ($n \geqslant 3$; измерение количества минерализованного кальция в образцах до и после имплантации) повторах.

Результаты и их обсуждение. Было обнаружено, что полученные авторским коллективом остеоматрицы не обладают цитотоксическим действием, материал не ингибирует митотическую активность и не препятствует прикреплению и пролиферации клеток. Качественная окраска на липиды показала, что в костных материалах содержались лишь следовые количества липидов, а повреждений трабекулярных структур матрикса не наблюдалось. Через 6 нед гетеротопической имплантации была обнаружена активная репопуляция матрикса имплантатов клетками реципиента с практически 100%-м заселением трабекулярных лакун и одновременным отсутствием признаков пограничной резорбции донорской костной ткани, свидетельствующим об остеоинтеграции и высокой биосовместимости разработанных биоматериалов. Помимо этого, наблюдались признаки неоваскуляризации с образованием дефинитивных сосудов на фоне инволюции и отсутствия врастания реактивно-измененной соединительной ткани в матриксе имплантата. При проведении количественного измерения минерализованного кальция в образцах через 6 и 13 нед имплантации, выполненном в сравнении с морфологическим анализом типа кальцификации биоматериалов (физиологическая или деструктивная) также были выявлены признаки активной биоинтеграции донорских матриц с постепенным увеличением площади минерализации без признаков утилизационной резорбции имплантированных образцов.

Заключение. Полученные в ходе разработанной щадящей детергентно-ферментативной обработки, децеллюляризированные, делипидизированные и деминерализованные остеоматрицы обладают выраженным свойствами биосовместимости, остеокондуктивности и частичной остеогенности и, следовательно, могут быть рекомендованы для разработки биоматериалов для направленной регенерации костной ткани. Исследование регенеративного потенциала биоматериалов, полученных с помощью разработанного авторами способа, будет проведено в дальнейшей работе с использованием модели ортотопической имплантации (long-size-дефекты) лабораторным животным.

Работа проведена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «ФИМТ» (№ ФИМТ-2014-136), ГЗ ВУЗу (Проект № 768), а также Фонда содействия РМП НТС.

Литература

1. Кооперация научных центров с целью разработки новых костнопластических материалов для травматологии и ортопедии / Лекишвили М. В., Склянчук Е. Д., Акатов В. С., Очкуренко А. А., Гурьев В. В., Розанов В. В., Матвейчук И. В., Рябов А. Ю., Фадеева И. С., Юрасова Ю. Б. // Технологии жив. систем.— 2015.— Т. 12, № 4.— С. 70–73.
2. Костнопластические остеоиндуктивные материалы в травматологии и ортопедии / Лекишвили М. В., Склянчук Е. Д., Акатов В. С., Очкуренко А. А., Гурьев В. В., Рагинов И. С., Бугров С. Н., Рябов А. Ю., Фадеева И. С., Юрасова Ю. Б., Чеканов А. С. // Гений ортопедии.— 2015.— № 4.— С. 61–67.

ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОТОКА В МОДЕЛИ СИГМОВИДНОГО СИНУСА ЧЕЛОВЕКА

[1,3]А. А. Тулупов, [2,3]В. Н. Горев

[1]Институт «Международный томографический центр» СО РАН, Новосибирск, Россия

[2]Институт теоретической и прикладной механики им. С. А. Христиановича СО РАН, Новосибирск, Россия

[3]Новосибирский государственный университет, Россия

taa@tomo.nsc.ru

Актуальность. Развитие таких методов лучевой диагностики как ультразвуковое исследование (УЗИ), мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ) сделало более доступным изучение течений биологических жидкостей (крови, ликвора, желчи, мочи и др.) в организме человека. Пожалуй, будет справедливым сказать, что такими исследованиями занимаются многие медицинские учреждения, имеющие необходимое оборудование. Однако измерения на пациентах накладывают ряд ограничений на эксперимент, например — нельзя увеличить размер сосуда, изготовить новый, также затруднительно проведение длительных экспериментов. Именно поэтому, для подробных исследований требуются эксперименты на моделях. В этом случае возникают проблемы с моделированием стенок, особенно эластичных, а также создание заданных условий на входе модели. Большая часть работ по исследованиям на моделях лишь качественно повторяет течения в живом организме. С другой стороны, активно ведутся исследования на физических, упрощенных моделях, например — каналов с ветвлениями, а также каналов с локальными сужениями или расширениями, имитирующих стеноз, тромбоз или аневризму.

Несмотря на это, количество фактических данных в литературе пока недостаточно и не дает возможности создать целостную картину кровообращения в организме человека, оставляя нерешенным круг задач, связанных с характером течения жидкостей (крови) в полых трубчатых структурах (сосудах), требующих моделирования с увеличением масштаба и сохранением гидродинамического подобия течения, учитывая физико-химические свойства жидкости и строение сосудистой стенки (жесткая или эластичная).

Материалы и методы. В работе проведено исследование характера течения крови в сигмовидном синусе — участке сложной системы венозных коллекторов центральной нервной системы человека, который находится на выходе из полости черепа. Исследование проведено на масштабной модели данной сосудистой структуры с сохранением подобия по числу Рейнольдса ($Re_d \approx 100$). Все измерения проведены на МР-томографе «Achieva» фирмы «Philips» с напряженностью магнитного поля 1,5 Тесла. В исследовании использована методика количественной оценки потока Quantitative Flow на основе двухмерной фазо-контрастной МР-ангиографии.

Результаты исследования. На основании геометрии сигмовидного синуса здорового добровольца, полученной при проведении МР-ангиографии, была создана компьютерная модель канала данного сосуда, которая затем была выполнена из пластика методом 3D печати. В настоящем эксперименте в качестве граничных условий на входе использовался легко воспроизводимый профиль Пуазеля — установившееся ламинарное течение в круглой трубе, имеющее параболический профиль, а также профиль, моделирующий течение на входе в этот участок сосуда в естественных условиях (*in vivo*). Весь макет был подключен к водяному насосу.

Предварительные измерения при больших расходах жидкости показали, что расход жидкости, вычисленный интегрированием профиля Пуазеля на входе в модель, который был получен в результате проведенной фазо-контрастной МР-ангиографии, составил: V_2=9,4 мл/с, что не более чем на 5% отличается от заданных значений объемной скорости потока V_1=9,0 мл/с, измеренной по ротаметру (РМ-02-0,04ЖУЗ). Подобное модельное исследование подтверждает точность измерений скоростных характеристик потока крови методом фазо-контрастной МР-ангиографии у людей и объясняет высокую корреляцию данных, полученных с помощью МРТ методик количественной оценки потока и транскраниальной допплерографии.

В результате проведенных измерений выявлено, что канал сигмовидного синуса разворачивает поток крови примерно на 90 градусов относительно его первоначального направления и направляет в яремную вену. Однако

при этом форма канала избыточно сложна — вместо простого поворотного канала сигмовидный синус состоит из двух сложных колен. Как показали измерения полей скорости, оба колена придают потоку крови продольную завихренность, причем в одном направлении. В итоге, на выходе из канала синуса наблюдается интенсивно вращающийся поток, с шагом спиральной линии тока в ядре течения примерно равным диаметру канала.

Заключение. В результате проведенных измерений выявлено, что канал сигмовидного синуса разворачивает поток крови примерно на 90 градусов относительно его первоначального направления и направляет в яремную вену. Как показали измерения полей скорости, сигмовидный синус формирует на входе из полости черепа поток с сильной продольной завихренностью, причем в одном направлении. В итоге, на выходе из канала синуса наблюдается интенсивно вращающийся поток, с шагом спиральной линии тока в ядре течения примерно равным диаметру канала. Полученные в результате исследования качественные и количественные данные об особенностях потока жидкости в модели сигмовидного синуса человека расширяют фундаментальные представления о характере венозного оттока от головного мозга, что, несомненно — позволяет глубже раскрыть физиологические механизмы церебральной гемодинамики и открывает принципиально новое направление для дальнейших научных исследований в этой области.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00020) в части работ по магнитно-резонансной томографии, гранта Президента РФ (проект № МД-5175. 2016.7) в части работ по моделированию потока и при финансовой поддержке ФАНО России по теме 0333-2014-0003 в теоретической части.

ЛАТЕНТНЫЙ ПЕРИОД САККАДЫ И АНТИСАККАДЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАРАДИГМЕ «GO/NO GO DELAY»

[1]А. А. Федотова, [1]М. А. Чурикова, [1,2]М. В. Славуцкая
[1]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия
[2]Центр психического здоровья, лаборатория Нейровизуализации и мультимодального анализа, Москва, Россия
fedotova.anna.2012@post.bio.msu.ru

Введение. Проблема торможения и его участия в когнитивном контроле двигательных ответов в настоящее время остается одной из центральных в нейро- и психофизиологии. Перспективной моделью для исследования механизмов когнитивного контроля являются саккадические движения глаз, которые как компонент зрительного восприятия и внимания включены во все формы двигательного поведения. Нарушения саккадических движений наблюдаются при многих психических заболеваниях.

Материалы и методы. Исследование проведено на 15 здоровых испытуемых-правшах. Применяли экспериментальную схему «Go/No go delay» с тремя типами зрительных стимулов: фиксационным в центре экрана (ЦФС), периферическими сигнальным (ПС) и целевым (ПЗС), а также паузой длительностью 2800–3000 мс между ПС и ПЗС. На каждом испытуемом проводили 2 эксперимента с ответами на «go» стимул в виде саккады или антисаккады, которые регистрировали с помощью электроокулографии. Целевые стимулы «go» и «no go» (на который взор переводить не следовало) предъявлялись в случайном порядке с вероятностью 50%. Достоверность различий средних значений изучаемых показателей вычисляли с помощью непараметрического двухвыборочного критерия Вилкоксона.

Результаты и их обсуждение. При анализе полученных данных выявлена зависимость величины латентного периода (ЛП) саккадических реакций от типа ответа и пространственного расположения целевых стимулов. В обоих экспериментальных вариантах схемы «Go/No go delay» были установлены однонаправленные латеральные различия средней величины ЛП в виде уменьшения ЛП движений глаз вправо на 7±3 мс ($p<0,05$). Показано увеличение средней величины ЛП антисаккады по сравнению с саккадой на 46±3 мс ($p<0,05$) независимо от пространственного расположения стимулов.

Зарегистрированы ошибочные ответы следующих типов: 1) в саккадической схеме — саккады на стимул «no go» (10%), 2) в антисаккадической схеме — саккады на «go» (12%) и «no go» стимулы (11%), а также антисаккады на «no go» стимулы (10%). ЛП ошибочного ответа был меньше, чем правильного, в обоих условиях эксперимента: на 116±5 мс для саккад и на 139±5 мс для антисаккад ($p<0,05$). Для ЛП ошибочных саккад в антисаккадической схеме показана противоположная пространственная асимметрия по сравнению с правильными ответами: ЛП левосторонних саккад был меньше, чем правосторонних, на 65±12 мс ($p<0,05$).

Увеличение среднего значения ЛП антисаккады по сравнению с саккадой может отражать бóльшую сложность программирования антисаккады, включающего дополнительную нагрузку на пространственное внимание, торможение непроизвольной саккады на зрительный стимул и перекартирование моторного вектора саккады в симметричную точку пространства [1]. Латеральные различия в ЛП саккадических ответов могут быть обусловлены ведущей ролью левого полушария в моторном контроле у праворуких испытуемых, а также в моторном внимании, которое усиливается при введении длительной межстимульной паузы в ситуации конфликта стимулов [2].

Ошибочные саккады рассматривают как рефлекторные движения, вызванные автоматическим «захватом» внимания периферическим зрительным стимулом. Подобная природа ошибок в нашей работе подтверждается уменьшением среднего значения ЛП ошибочных саккад в левое полуполе по сравнение с саккадами вправо. Саккады влево контролируются правым полушарием, доминирующим в процессах пространственного внимания [2–4].

Выводы:

1. Показано усиление моторного внимания и доминирование ведущего левого полушария в организации произвольной антисаккады в экспериментальной схеме «Go/No go delay».
2. Выявлено, что усиление непроизвольного внимания к периферическому стимулу приводит к ослаблению произвольного торможения рефлекторного ответа и появлению ошибочных движений глаз.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда Фундаментальных Исследований (проекты № 14-04-01634 и № 16-04-01079).

Литература

1. *Brown M. R., Goltz H. C., Vilis T., Ford K. A., Everling S.* Inhibition and generation of saccades: Rapid event-related fMRI of prosaccades, antisaccades, and nogo trials // NeuroImage.— 2006.— Vol. 33, № 2.— P. 644–659
2. *Caeyenberghs K., Leemans A.* Hemispheric lateralization of topological organization in structural brain networks // Hum Brain Mapp. — 2014.— Vol. 35, № 9.— P. 4944–4957.
3. *Брагина Н. Н., Доброхотова Т. А.* Функциональные асимметрии человека.— М.: «Медицина», 1988.— 237 с.
4. *Coull J. T.* Neural correlates of attention and arousal: insights from electrophysiology, functional neuroimaging and psychopharmacology // Prog. Neurobiol.— 1998.— Vol. 55, № 4.— P. 343–361.

ВНИМАНИЕ: НЕЙРОПСИХОЛОГИЧЕСКИЕ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАТТЕРНЫ

Ф. А. Хазипова, С. И. Низамутдинов, Л. З. Рашитов

Казанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Казань, Россия

farida.hazipova@tatar.ru

В психологии внимание определяется как процесс и состояние настройки субъекта на восприятие приоритетной информации и выполнение поставленных задач. Направленность и сосредоточенность психической деятельности при внимании обеспечивает более эффективное восприятие информации. В общем плане выделяют два основных вида внимания: непроизвольное и произвольное (избирательное, селективное). Оба вида внимания имеют разные функции, по-разному формируются в онтогенезе, и в их основе лежат различные физиологические механизмы. Первые исследования внимания методом вызванных потенциалов (ВП) использовали простые поведенческие модели, например, счет стимулов. При этом было установлено, что привлечение внимания испытуемых к стимулу сопровождается увеличением амплитуды компонентов ВП и сокращением их латентности. Напротив, отвлечение внимания от стимула сопровождается снижением амплитуды ВП и увеличением латентности [1]. В нашей работе мы использовали тест, изменяющий общий уровень активации внимания: реакцию модулирующих систем на открытие глаз.

Целью работы явилась идентификация функции непроизвольного внимания с помощью электрофизиологического метода регистрации вспышечных зрительных вызванных потенциалов (ВЗВП), отражающего анатомо-функциональную структуру регулирующих систем мозга.

Задачей работы явилась регистрация ВЗВП в условиях закрытых (ЗГ) и открытых (ОГ) глаз и оценка особенностей количественных показателей диагностического метода, связанных с разными функциональными состояниями головного мозга: покоя (ЗГ) и активного бодрствования (ОГ).

Методы исследования. Регистрация ВЗВП осуществлялась при помощи четырехканального электроней-ромиографа «Нейро-МВП-4» производства компании «Нейрософт» (г. Иваново). Электроды для записи ЗВП устанавливались по международной системе 10–20 на точки Oz (активный электрод), Cz (референтный) и Fpz (заземляющий). Импеданс под электродами не превышал 5 кОм. Для стимуляции использовалась вспышка от матрицы светодиодов, вставленной в специальные очки, плотно прилегающие к лицу. Длительность стимула составляла 5 мс, частота — 1 Гц, длина волны генерируемой вспышки — 640 нм (красный свет), эпоха регистрации — 400 мс, полоса фильтрации — 2–100 Гц. Засвет подавался монокулярно в условиях ЗГ и ОГ. Результирующие кривые являются усредненными по данным 40—60 регистраций единичных импульсов. Оценивали изменение количественных показателей амплитуд (N1P2, P2N2, N2P3), латентностей (P2, N2) и интервалов (P1P2, P2P3) ВЗВП.

Результаты

1. Наиболее отчетливые изменения зарегистрированы при измерении амплитуд N1P2 и P2N2 — увеличение в условиях открытых глаз
2. Уменьшение амплитуды N2P3
3. Увеличение интервала P1P2
4. Увеличение пиковой латентности N2-компонента
5. Интервал P2P3 стабилен за счет уменьшения интервала N2P3

Увеличение амплитуд N1P2, P2N2 иллюстрирует увеличение количества вовлеченных в условиях ОГ нейронов первичной и вторичной зрительной коры обоих полушарий

головного мозга. Увеличение интервала P1P2, а также увеличение латентности N2 компонента иллюстрирует увеличение времени работы структур первичной и вторичной зрительной коры. Уменьшение амплитуды N2P3 свидетельствует об ослаблении функции тормозных регулирующих систем зрительных бугров. Уменьшение интервала N2P3 указывает на относительно самостоятельную функциональную систему ассоциативной коры головного мозга [2].

Выводы:

1) Изменчивость количественных показателей в ВЗВП в тесте с ГО/ГЗ иллюстрирует разную степень активности неспецифических (ретикулярная формация ствола мозга) модулирующих систем головного мозга.

2) Возбуждение восходящих активирующих систем ретикулярной формации понтобульбарного мозга проявляется увеличением амплитуд N1P2, P2N2 и интервала P1P2, соответствующих увеличению работы первичной и вторичной зрительной коры, а также уменьшению амплитуды N2P3, соответствующей уменьшению тормозных модулирующих влияний зрительного бугра.

3) Неспецифическое возбуждающее влияние красного светового стимула активизирует неспецифическую регулирующую систему заднего мозга и, как следствие, корковых структур всей поверхности головного мозга, что соответствует первому (энергетическому) уровню по Лурии [3].

4) Предложенный метод тестирования (ВЗВП ГО/ГЗ) может быть использован для изучения механизмов активизации ретикулярных образований заднего мозга, обеспечивающих функционирование непроизвольного внимания, и применяться для выявления нарушений психофизиологических функций внимания.

Литература

1. *Марютина Т. М., Ермолаев О. Ю.* // Введение в психофизиологию — М.: Флинта, 2001.— 400 с.
2. *Хазипова Ф. А., Низамутдинов С. И.* Изменчивость качественных и количественных показателей ВЗВП в онтогенезе // Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы. Материалы Международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов (г. Казань, 9–10 апреля 2015 г.).— Казань: ООО «Новое знание», 2015.— С. 230–236.
3. *Лурия А. Р.* Функциональная организация мозга // Естественно-научные основы психологии / Под. ред. А. А. Смирнова, А. Р. Лурия, В. Д. Небылицына.— М.: Педагогика, 1978.— С. 109–139.

ХРОНИЧЕСКОЕ ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1β В РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ПРИВОДИТ К ОТДАЛЕННЫМ НАРУШЕНИЯМ РАБОЧЕЙ ПАМЯТИ КРЫС

[1]А. П. Шварц, [2]А. Ю. Ротов, [3]О. И. Чуприна, [1]А. Н. Трофимов, [5]Ищенко А. М., [1,4]О. Е. Зубарева, [1]В. М. Клименко

[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия
[3]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия
[4]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия
[5]Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург

aleksandr.pavlovich.schwarz@gmail.com

Введение. Различные виды перинатальной патологии являются причиной высокого риска нарушения когнитивных функций у детей и взрослых, что может быть связано с повышением продукции провоспалительных цитокинов, в т. ч. интерлейкина(ИЛ)-1β,— основного посредника нейроиммунных взаимодействий. В ранние периоды развития ИЛ-1β является необходимым фактором для нормального развития центральной нервной системы, однако введения цитокина или индукторов его синтеза в ранние периоды постнатального онтогенеза приводят к отдаленным нарушениям поведения экспериментальных животных [1–3]. Ранее в нашей Лаборатории было показано нарушение условнорефлекторной деятельности и пространственной памяти у взрослых крыс после введений ИЛ-1β в течение 3-й недели жизни [4, 5]. Однако неясно, сопровождаются ли данные нарушения нарушениями рабочей памяти, и когда они начинают проявляться.

Целью данной работы явилось изучение особенностей рабочей памяти крыс, имевших повышенный уровень ИЛ-1β в раннем постнатальном периоде онтогенеза.

Объекты, материалы и методы. Работа выполнена на 170 крысятах-самцах Wistar с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества № 86/609 ЕС). Проведение исследования одобрено Этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ». Крысятам с 15-го по 21-й день жизни один раз в сутки внутрибрюшинно вводили человеческий рекомбинантный ИЛ-1β (ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России) в умеренно пирогенной дозе (1 мкг/кг), либо апирогенный физиологический раствор (ФР), а также была отобрана группа интактных животных (крысята одного помета использовались во всех 3 группах). Тестирование рабочей памяти у неполовозрелых (25 дней), перипубертатных (42–47 дней) и взрослых (75–90 дней) животных производили в тесте спонтанных альтернаций при обследова-

нии Y-образного лабиринта [6], на различных группах для каждого возраста. Данные анализировали в программе IBM SPSS Statistics 22 (США), используя непараметрический H-критерий Краскела — Уоллиса с последующим попарным сравнением групп U-критерием Манна — Уитни с поправкой Бонферрони, т.к. в части групп распределение данных отличалось от нормального (критерий Колмогорова — Смирнова).

Результаты. Введение ИЛ-1β в течение 3-й недели жизни отражалось в более низком показателе спонтанных альтернаций при обследовании Y-лабиринта (H=14,8; p=0,001): данный показатель в опытной группе составил 52,6 (46,2; 56,6) %, что достоверно ниже показателей интактных (63,6 (54,8; 74,6)%; U=3,6; p=0,001) и получавших ФР (66,7 (53,9; 72,3)%; U=3,2; p=0,004) крыс. При тестировании крыс в возрасте 42–47 дней также обнаруживалось влияние цитокина на показатели рабочей памяти (H=10,9; p=0,004): животные, получавшие ИЛ-1b, совершали меньше спонтанных альтернаций (42,9 (40; 55,4)%), чем интактные (68,7 (52; 72,7)%; U=2,8; p=0,013) и получавшие ФР (62,5 (54,6; 66,7)%; U=2,7; p=0,019). Тот же эффект наблюдался и при тестировании половозрелых крыс (H=8,69; p=0,014): доля альтернаций в опытной группе составила 58,3 (51,6; 70,4)%,— ниже показателей групп интактных животных (72,2 (58,8; 81,3)%; U=2,6; p=0,028) и тех, которым вводили ФР (68,8 (65; 75)%; U=2,4; p=0,043). Данные представлены в виде медиан и квартилей.

Заключение. В данном исследовании впервые показано, что хроническое повышение уровня ИЛ-1β в раннем постнатальном периоде онтогенеза приводит к нарушениям рабочей памяти животных, возникающим уже в предпубертатный период и носящим долговременный характер. Наблюдаемые нарушения могут отражать обусловленные действием цитокина нарушения процессов нейропластичности и позволяют рассматривать использованный подход как перспективный для моделирования когнитивных нарушений, возникающих у детей и подростков вследствие перенесенной перинатальной патологии.

Исследование поддержано РФФИ (научный проект № 16-34-00873 мол_а).

Литература

1. *Spulber S., Bartfai T., Winblad B., Schultzberg M.* Morphological and behavioral changes induced by transgenic overexpression of interleukin-1ra in the brain // J. Neurosci. Res.— 2011.— Vol. 89, № 2.— P. 142–152.
2. *Bilbo S. D., Schwarz J. M.* The immune system and developmental programming of brain and behavior // Front. Neuroendocrinol.— 2012.— Vol. 33, № 3.— P. 267–286.
3. *Зубарева О. Е., Елисеева А. П., Симбирцев А. С., Клименко В. М.* Влияние провоспалительных цитокинов на становление поведения в раннем постнатальном онтогенезе // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.— 2005.— Т. 91, № 4.— С. 374–384.
4. Нарушение условнорефлекторной деятельности взрослых крыс после введений интерлейкина-1 в раннем постнатальном онтогенезе / Зубарева О. Е., Щербакова К. П., Калеменев С. В., Симбирцев А. С., Клименко В. М. // Журн. высш. нерв. деятельности им. И. П. Павлова.— 2011.— Т. 61, № 6.— С. 736–741.
5. *Трофимов А. Н., Зубарева О. Е., Симбирцев А. С., Клименко В. М.* Влияние неонатальных повышений уровня интерлейкина-1β на формирование пространственной памяти взрослых крыс // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.— 2012.— Т. 98, № 6.— С. 782–792.
6. *Sarter M., Bodewitz G., Stephens D. N.* Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist β-carbolines // Psychopharmacology.— 1988.— Vol. 94, № 4.— P. 491–495.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ И МИКРОКАПИЛЛЯРОВ СЕРДЦА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕКСИКОРА У КРЫС С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ

А. В. Шумилова, А. В. Дерюгина

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Россия

shumilowanastya@gmail.com

Введение. Тяжесть больных с черепно-мозговой травмой (ЧМТ) определяется не только изменениями со стороны центральной гемодинамики, но и состоянием микрогемоциркуляции [1]. При исчерпании возможностей компенсации нарушений церебральной микроциркуляции физиологические механизмы трансформируются в повреждающие, приводящие к дальнейшей альтерации, к тканевой гипоксии, деградации клеточных мембран и гибели клеток, появлению в межклеточной жидкости, а затем и системном кровотоке продуктов, не свойственных нормальному тканевому метаболизму, приводящих к глобальной и региональной перфузии органов и тканей. Учитывая, что особое значение среди всех экстракраниальных нарушений при ЧМТ отводится расстройствам сердечно-сосудистой системы, то актуальность и целесообразность поиска препаратов, оказывающих корригирующее воздействие на микроциркуляцию сердечной мышцы, не подлежит сомнению.

Цель. Оценить в эксперименте эффективность мексикора на функциональные показатели эритроцитов и структуру микроциркуляции миокарда у крыс в условиях посттравматического периода.

Материалы и методы. Животным после моделирования ЧМТ, путем свободного падения груза [2], в течение 12 дней ежедневно внутрибрюшинно вводили Мексикор (8 мг/кг) (опытная группа), контролем служили животные, инъецированные физраствором. Забор крови производили на 1-, 3-, 7- и 12-е сутки после альтерации и измеряли электрофоретическую подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) методом микроэлектрофореза, уровень агрегации путем подсчета одиночных эритроцитов в камере Горяева, концентрацию МДА по реакции с тиобарбитуровой кислотой [3]. На 3, 7 и 12 сутки с момента нанесения ЧМТ на фоне внутрибрюшинного наркоза тиопенталом натрия (100 мг/кг) крыс декапитировал (по 6 животных), производили срединную торакотомию, иссекали сердце, готовили биоптаты миокарда левого желудочка. Ультратонкие срезы просматривали на электронном микроскопе Morgagni 268D (фирмы FEI США) и фотографировали с помощью видеокамеры Mega View III. Полученные данные обработаны с помощью пакетов прикладных программ BIOSTAT и Microsoft Excel. Достоверность различий средних определяли по t-критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p<0,05$.

Результаты исследований показали, что к 1 суткам после ЧМТ у крыс снижалась ЭФПЭ, возрастала степень агрегации и концентрация МДА в эритроцитах, что сочеталось с изменениями ультраструктуры микроциркуляторного русла миокарда левого желудочка по сравнению с интактной группой животных. На фоне введения мексикора на 3 сутки посттравматического периода наблюдалось увеличение ЭФПЭ на 20%, уменьшение концентрации МДА на 61% и степени агрегации на 36% относительно контрольной группы животных. Выявленная тенденция сохранялась к 7 суткам наблюдения, что сопровождалось значимым улучшением микроциркуляции. Так, в большинстве капилляров (65%) опытной группы наблюдались эритроциты и тонкодисперсный аморфный осмиофильный материал, что указывает на наличие циркуляции в микрососудах (no-refloy), в то время как в контрольной группе число сосудов, не содержащих осмиофильного аморфного материала и форменных элементов крови (no-refloy), было больше. К 12 суткам посттравматического периода в обеих группах наблюдалось постепенное восстановление функциональных показателей эритроцитов и структуры микроциркуляторного русла, но с сохранением более выраженных изменений в контрольной группе животных.

Вывод. Мексикор, обладая энергосинтезирующим, антирадикальным и кислородснабжающим эффектами, оказывает коррегирующее воздействие на клеточном (восстановление реологических показателей крови), тканевом (восстановление микроциркуляции) и системном уровне (восстановление работы сердечно-сосудистой системы), что в значительной степени должно предотвращать вторичные повреждения мозга.

Литература

1. *Чурляев Ю. А., Вереин М. Ю., Данцигер Д. Г., Кан С. Л., Мартыненков В. Я., Григорьев Е. В.* Нарушения микроциркуляции, внутричерепного и церебрального перфузионного давления при тяжелой черепно-мозговой травме // Общ. реаниматол.— 2008.— Т. IV, № 5.— С. 5–9.
2. *Цымбалюк В. И., Кочин О. В.* Экспериментальное моделирование черепно-мозговой травмы // Укр. Нейрохир. журн.— 2008.— № 2.— С. 10–12.
3. *Дерюгина А. В., Крылова Е. В., Лукьянова Л. Д.* Влияние убихинона-10 и янтарной кислоты на функциональные характеристики эритроцитов крыс при адреналовой токсемии // Бюл. экспер. биол. и мед.— 2006.— Т. 4, № 141.— С. 397–400.

ГЕПАТОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОТ ФТОРИСТОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ОРГАНИЗМА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Т. К. Ядыкина, Н. Н. Михайлова, А. Г. Жукова, Л. Г. Горохова, М. С. Бугаева

Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний, Новокузнецк, Россия

yadykina.tanya@yandex.ru

Введение. В основе патогенеза многих заболеваний лежат нарушения гомеостатических механизмов тканевого и клеточного метаболизма, возникающие в условиях воздействия на организм негативных производственных факторов. Исследовать такие нарушения позволяют экспериментальные модели,— в частности, модель фтористой интоксикации, отличительным признаком которой является совокупность метаболических нарушений, не встречающихся в виде подобного симптомокомплекса при воздействии какими-либо другими веществами [1]. Механизмы, обеспечивающие специфическое повышение резистентности организма в начальный период фтористой агрессии, изучены недостаточно. Известно, что печень является центральным органом химического гомеостаза, определяющим важную роль в адаптационных реакциях организма.

Целью исследования явилось изучение гепатоспецифических механизмов защиты организма на ранних стадиях экспериментальной фтористой интоксикации (ЭФИ).

Объекты, материалы и методы. Эксперимент проведен на самцах белых крыс (n=80) массой 200 г, разделенных на 2 группы: интактные животные и опытная группа (свободный доступ крыс к раствору NaF в концентрации

10 мг/л). На 2-е, 4-е сутки, через 1 и 3 недели оценивали содержание в плазме крови общего белка, альбумина, глюкозы, билирубина общего и прямого, активность ферментов: псевдохолинэстеразы (ПХЭ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), каталазы в ткани печени; ферментный статус лейкоцитов: α-глицерофосфатдегидрогеназ (α-ГФДГ) цитоплазматической и митохондриальной, сукцинатдегидрогеназы (СДГ). В эти же сроки проводили гистологический анализ тканей. Уровень фактора транскрипции HIF-1α (hypoxia-inducible factor 1-α), защитных белков HSP73 (heat shock protein 73), HOx-1 (heme oxygenase-1), -2 в печени определяли методом вестерн-блоттинга. Данные обрабатывали в программе Statistica 6.0 (StatSoft, США).

Результаты и их обсуждение. Гомеостатическое благополучие оценивается, прежде всего, по относительному постоянству состава крови,— наиболее реактивной системы организма. Начальный период ЭФИ характеризовался сохранением физиологического уровня общего белка и альбуминов, уровень которых в сыворотке крови снижался к 3-й неделе, что было обусловлено усилением глюкозо-аланинового шунта, а также использованием альбуминов в детоксикационной цепи на этой стадии. Уровень глюкозы в плазме крови сохранялся в физиологических пределах. Компенсаторно-приспособительные реакции являются энергоёмкими [2]. Повышение цитохимической активности СДГ, цитоплазматической α-ГФДГ на 15% и митохондриальной α-ГФДГ на 10% на 1-й неделе свидетельствовало о высоком энергетическом потенциале цикла Кребса. Пусковым механизмом, инициирующим процессы клеточной адаптации и поддержания гомеостаза, является активация внутриклеточных защитных систем [3]. С 4-х суток в печени усиливался синтез HIF-1α и белков, участвующих в метаболической адаптации: HOx-2 в 1,5 раза и HSP73 в 2 раза, регулирующих экспрессию ферментов антиоксидантной защиты. Отмечалось компенсаторное повышение активности каталазы в 1,5 раза и увеличение в 1,7 раза уровня прямого билирубина на фоне сохранения физиологического уровня общего, являясь своеобразной срочной ответной реакцией, подтверждающей активацию механизмов антиоксидантной защиты. Повышенный уровень защитных белков сохранялся в течение 3 недель. Увеличение уровня HIF-1α сопровождалось повышением в 2 раза активности АЛТ печени уже на 2-е сутки. Активность ферментов отражает динамику изменения функционального гомеостаза, позволяя судить о степени адаптивных возможностей органа [4]. Усиление пластических и энергетических обменных процессов (1-я, 3-я недели) сопровождалось включением всех путей энергосинтеза: активацией гликолиза, интенсивным метаболизмом белков и активным вовлечением фосфатов в биоэнергетические процессы (активность ЛДГ, АЛТ, ЩФ возросла в 1,7 раза). Физиологический уровень ПХЭ свидетельствовал о функциональной активности печени в этот период.

Заключение. Физиологический ответ организма на ЭФИ сопровождался константностью показателей белкового и углеводного обменов, которые обеспечивались достаточностью системы энергообеспечения, энзимологической активностью, направленных на поддержание гомеостаза печени и организма в целом. Ведущим фактором каскада специфических защитных механизмов явилась стрессорная компонента от поступления фтора в организм еще до начала его токсического действия и активация компонентов редокс-сигнальной системы, что проявилось усилением синтеза защитных белков в печени на фоне относительной сохранности морфоструктуры. Вакуолизация ядер, увеличение числа двуядерных гепатоцитов,— признаков регенерации и усиления синтетических процессов, являются частью общей гепатоспецифической защиты от фтористой агрессии.

Литература

1. *Агалакова Н. И., Гусев Г. П.* Влияние неорганического фтора на живые организмы различного филогенетического уровня // Журн. эволюц. биохимии и физиологии.— 2011.— Т. 47, № 5.— С. 337–347.
2. *Долгушин М. В., Вахрин А. С., Юшков Г. Г., Колесник Д. И.* Цитохимическая оценка метаболических изменений в лейкоцитах периферической крови крыс в условиях хронической интоксикации тетрафторидом германия // Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН.— 2005.— № 1.— С. 157–160.
3. *Архипенко Ю. В., Сазонтова Т. Г., Жукова А. Г.* Повышение резистентности мембранных структур сердца, печени и мозга при адаптации к периодическому действию гипоксии и гипероксии // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 2005.— Т. 140, № 9.— С. 257–260.
4. *Рослый И. М., Абрамов С. В., Покровский В. И.* Ферментемия — адаптивный механизм или маркёр цитолиза? // Вестн. РАМН.— 2002.— № 8.— С. 3–9.

БИОМЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ, БИОФИЗИКА, ГЕНЕТИКА

МЕЖВИДОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ДО И ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ 1,3,4-ТИАДИАЗИНА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

[1]Н. Ж. Алисултанова, [1]Н. А. Вахнина, [1]В. Д. Шадрина, [1]Е. Р.Бойко, [2]Л. П. Сидорова, [2,3]О. Н. Чупахин
[1]Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН, Сыктывкар, Россия
[2]Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия
[3]Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН России, Екатеринбург, Россия

alisultanova.nadezhda@mail.ru

Производные 1,3,4-тиадиазина обладают широким спектром физиологического действия [1], среди которых обнаружены вещества с гипометаболическим эффектом, чей механизм действия остается не известным. Среди причин развития гипометаболизма выделяют снижение функционирования митохондриальных ферментов, участвующих в процессах энергообразования, одним из которых является сукцинатдегидрогеназа (СДГ). Поэтому целью исследования было оценить активность СДГ митохондрий печени различных млекопитающих до и после воздействия производных 1,3,4-тиадиазина в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись половозрелые крысы линии Wistar (n=25), кролики (n=5), кошки (n=2) и свинья (n=1). Митохондриальную фракцию клеток печени получали методом дифференциального центрифугирования [2]. Определение концентрации белка в суспензии митохондрий осуществляли биуретовым методом [3]. Растворы производных 1,3,4-тиадиазина (L-10, L-14, L-17, L-29, ТД-100, синтезированные в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН России, г. Екатеринбург) готовили на диметилсульфоксиде в концентрации 10 мг/мл. Митохондрии инкубировали с растворами тиадиазинов в соотношении 1:1 в течение 10 мин. Активность СДГ митохондрий печени млекопитающих определяли феррицианидным методом [4]. Значимость различий оценивали с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса с последующим использованием метода Дана. Значения активности СДГ представлены как M±SD, различия считали значимыми при $p<0,05$.

Результаты. Активность СДГ нативных митохондрий печени свиньи составила 13,1 нмоль сукцината/мин мг белка, крыс — 10,07±2,47 нмоль сукцината/мин мг белка, кошек — 5,27±0,04 нмоль сукцината/мин мг белка, кроликов — 3,59±1,90 нмоль сукцината/мин мг белка.

Соединения L-10, L-14, L-17, L-29, ТД-100 оказали ингибирующее воздействие на активность СДГ митохондрий печени млекопитающих в различной степени выраженности. Под влиянием соединения L-10 активность фермента кроликов была полностью подавлена, у крыс снизилась в 7 раз относительно нативных митохондрий ($p<0,001$), у кошек и свиньи в 4 и 3,5 раз соответственно. После инкубации митохондрий с веществом L-29 активность СДГ печени кроликов снизилась в 36 раз, относительно контроля ($p<0,05$), у крыс — в 7 раз ($p<0,001$), у кошек и свиньи — 3 и 3,5 раза, соответственно. Воздействие тиадиазина L-17 привело к ингибированию СДГ митохондрий печени кроликов в 14 раз по сравнению с контролем, крыс — в 5 раз ($p<0,001$), у кошек и свиньи — в 4 раза относительно нативных митохондрий. Под влиянием вещества L-14 активность митохондриального фермента у кроликов снизилась в 5,5 раз по сравнению с контрольным значением, у крыс — в 3 раза ($p<0,01$), у кошек и свиньи — в 3,5 и 4,5 раза соответственно. В результате инкубации митохондрий печени млекопитающих с соединением ТД-100 активность СДГ у кроликов снизилась в 3,6 раза относительно контроля, у крыс — в 3 раза ($p<0,01$), у кошек и свиньи — в 2 раза по с равнению с нативными митохондриями.

Межвидовые различия в СДГ-ой активности митохондрий печени млекопитающих, очевидно, связаны с особенностями метаболических процессов у этих видов [5]. Наибольшая ингибирующая активность тиадиазинов L-10, L-17, L-29 по отношению к СДГ митохондрий млекопитающих, вероятно, обусловлена наличием в их структуре морфолиновой группы во втором положении тиадиазинового кольца. Замена морфолинового производного в соединениях L-14 и ТД-100 на аминопропилморфолиновую и циклопропиламиновую группы, соответственно, приводит к снижению степени их воздействия на митохондриальный фермент [6]. Максимальная степень влияния тиадиазиновых соединений показана для митохондрий печени кролика, что связано с изначально низкой активностью фермента нативных митохондрий.

Выводы:

1. Производные 1,3,4-тиадиазина L-10, L-14, L-17, L-29, ТД-100 ингибируют активность СДГ митохондрий печени млекопитающих в условиях *in vitro*.

2. Наличие морфолинового фрагмента в химической структуре соединений L-10, L-17, L-29 обуславливает их наибольшую степень воздействия на СДГ, по сравнению с веществами L-14, ТД-100.

3. Наименьшая активность СДГ до и после инкубации митохондрий с производными 1,3,4-тиадиазина показана для печени кроликов, по сравнению с крысами, кошками и свиньей.

Литература

1. Влияние новых соединений класса 1,3,4-тиадиазинов на агрегацию тромбоцитов *in vitro* и *ex vivo* / Логвинова Ю. С, Васильева Т. М., Макаров В. А., Чупахин О. Н., Сидорова Л. П., Перова Н. М., Русинов В. Л. // Экспериментальная и клиническая фармакология.— 2010.— Т. 73, № 8.— С. 21–25.
2. *Jacobus W. E., Saks V. A.* Creatine kinase of heart mitochondria: Changes in its kinetic properties induced by coupling to oxidative phosphorylation // Arch Biochem Biophys.— 1982.— Vol. 19.— P. 167–178.
3. *Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. J.* Determination of serum proteins by means of the biuret reaction // Biol Chem.— 1949.— Vol. 177 (2). –P. 751–66.
4. *Singer T. P., Kearney E. B.* Determination of succinic dehydrogenase activity // Methods Biochem Anal.— 1957.— Vol. 4.— P. 307–333.
5. *Каркищенко Н. Н.* Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. М.: Изд-во ВПК, 2007. 320 с.
6. Влияние производных 1,3,4-тиадиазинов на активность сукцинатдегидрогеназы печени крыс / Вахнина Н. А., Алисултанова Н. Ж., Шадрина В. Д., Бойко Е. Р., Сидорова Л. П., Чупахин О. Н. // В мире научных открытий.— 2014.— № 2 (50).— С. 44–55.

ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ СЕМЕЙСТВА Vsx В ХОДЕ РЕТИНОГЕНЕЗА У КУР

[1]*И. Н. Андрейченко*, [2]*Р. Д. Зиновьева*

[1]Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий, Москва, Россия

[2]Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Nikolavna.88@mail.ru

Введение. Причиной возникновения многих наследственных заболеваний глаз является нарушение экспрессии регуляторных генов глазного поля. Исследования генотип-фенотип корреляции не позволяют составить представление о молекулярных механизмах этих нарушений. Для этого необходима интеграция знаний, полученных при изучении морфогенеза глаза человека и других позвоночных, а также экспериментальные исследования, такие как мутагенез, нокаут генов и др., которые возможны только на животных. Удобной моделью является формирующаяся сетчатка, содержащая ограниченное число высокоспециализированных клеток [1], дифференцировка которых у всех изученных видов происходит в строгой последовательности и регулируется согласованной работой каскада транскрипционных факторов [2]. У кур ретиногенез осуществляются в первые 14 дней эмбриогенеза. В этот период можно анализировать экспрессию генов-регуляторов дифференцировки клеток сетчатки.

Цель. Мы сосредоточили наше внимание на изучении пространственных и временных особенностей экспрессии транскрипционных факторов семейства Vsx (Visual system homeobox) в ходе ретиногенеза у кур *Gallus Domesticus*.

Результаты и обсуждение. Семейство Vsx включает два гомологичных гена, *Vsx1/Chx10-1* и *Vsx2/Chx10*, у которых кроме гомео-домена есть Paired-like CVC-домен. Методом ПЦР в реальном времени нами установлено, что на уровне мРНК Vsx1/Chx10-1 и Vsx2/Chx10 начинают экспрессироваться на ранних этапах ретиногенеза, а максимальный уровень наблюдается на стадиях Е6-Е11, когда дифференцируются клетки и формируются ядерные слои, и на стадии Е14, когда слои сетчатки в основном уже сформированы (рис. 1 *а*, *г*). Место рисунка. На уровне белка Vsx1/Chx10-1

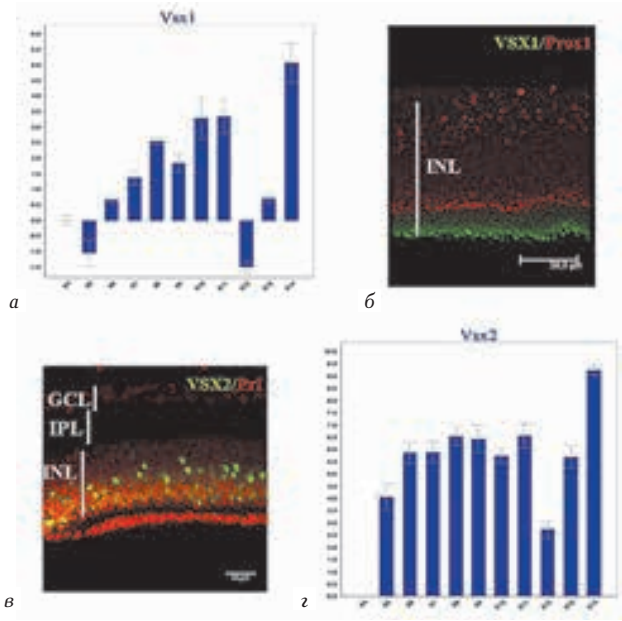


Рисунок. *а*, *г* — ПЦР-РВ-анализ экспрессии транскриптов Vsx1/Chx10-1 и Vsx2/Chx10 на стадиях Е4-Е14 развития сетчатки кур, в сутках. По оси ординат — уровень экспрессии исследуемых генов по отношению к уровню экспрессии на стадии Е4. *б*, *в* — иммуногистохимия сетчатки кур на стадии Е14 (четырнадцатый эмбриональный день развития). INL — внутренний ядерный слой; IPL — внутренний сетчатый слой; GCL — ганглиозный слой. Prox1 — маркер амакриновых клеток, PrI — ядерный краситель.

и Vsx2/Chx10 детектируются позднее, с 6 и 10 дня соответственно, в биполярных клетках внутреннего ядерного слоя сетчатки (рис. 1 *б*, *в*). С мутациями генов семейства Vsx/VSX позвоночных, в том числе человека, связывают аномалии формирования глаз и заболевания сетчатки,

такие как микрофтальмия и макулярная дегенерация сетчатки [3, 4]. Установлено, что CHX10/VSX2 активирует экспрессию фактора жизнеспособности колбочек, RdCVF, и может обладать терапевтическим потенциалом для лечения пигментного ретинита [5].

Вывод. На основании собственных и литературных данных сделано заключение, что факторы транскрипции Vsx1/Chx10-1 и Vsx2/Chx10 участвуют в регуляции как дифференцировки, так и функционирования биполярных клеток сетчатки. Понимание молекулярно-генетических механизмов клеточной дифференцировки важно для будущего регенеративной медицины.

Литература

1. *Young R. W.* Cell differentiation in the retina of the mouse // Anat. Rec. 1985. Vol. 212. P. 199–205.
2. *Harada T., Harada C., Parada L. F.* Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye // Genes Dev. 2007. Vol. 21. P. 367–378.
3. VSX2 mutations in autosomal recessive microphthalmia / Reis L. M., Khan A., Kariminejad A., Ebadi F., Tyler R. C., Semina E. V. // Mol Vis. 2011. Vol. 17. P. 2527–2532.
4. H244R VSX1 is associated with selective cone ON bipolar cell dysfunction and macular degeneration in a PPCD family / Valleix S., Nedelec B., Rigaudiere F., Dighiero P., Pouliquen Y., Renard G., Gargasson J. F., Delpech M. // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006. Vol. 47. P. 48–54.
5. Thehomeobox gene CHX10/VSX2 regulates RdCVF promoter activity in the inner retina / Reichman S., Kalathur R. K., Lambard S., Aït-Ali N., Yang Y., Lardenois A., Ripp R., Poch O., Zack D. J., Sahel J. A., Léveillard T. // Hum Mol Genet. 2010. Vol. 19. P. 250–261.

СТЕХИОМЕТРИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОНГО КРАСНОГО С ФИБРИЛЛАМИ МОДЕЛЬНЫХ АМИЛОИДОГЕННЫХ БЕЛКОВ

О. И. Антимонова, Д. С. Поляков, Н. А. Грудинина, М. М. Шавловский

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

oa0584@mail.ru

Введение. Фибриллогенез белков лежит в основе патогенеза целого ряда заболеваний, известных как амилоидозы. К настоящему времени номенклатура этих заболеваний включает 31 нозологическую единицу, в том числе болезнь Альцгеймера и диабет типа 2 [1]. Формирование фибрилл — сложный автокаталитический процесс, обусловленный изменением конформации белковых молекул с образованием аномальной пространственной структуры и их последующей упорядоченной агрегацией. Большинство методов детекции фибрилл основаны на их способности связываться с низкомолекулярными соединениями, в частности, с анионным азокрасителем Конго красный (КК). В литературе описано связывание этого красителя с фибриллами инсулина, поли-L-лизином [2] и фибриллами бета-амилоида [3]. Изучение механизмов взаимодействия КК с модельными фибриллами представляет интерес с точки зрения разработки новых соединений, специфичных к амилоидным фибриллам, которые могут использоваться для диагностики амилоидозов и ингибирования фибриллогенеза.

Целью работы являлось исследование особенностей взаимодействия красителя Конго красный с фибриллами лизоцима, а также рекомбинантных вариантов бета2-микроглобулина и транстиретина.

Материалы и методы. Для проведения экспериментов использовали коммерческий препарат КК, дополнительно очищенный путем переосаждения [4]. Модельные белки представляли собой лизоцим белка куриного яйца, рекомбинантный транстиретин (ТТР) человека и варианты рекомбинантного бета2-микроглобулина (б2М) человека: полноразмерный б2М и б2М, не содержащий 6 N-концевых (б2МΔ6) и 10 N-концевых (б2МΔ10) аминокислотных остатков. Стехиометрию связывания определяли титрованием постоянного количества фибрилл (в пересчете на молярную массу мономеров белков) возрастающими количествами красителя с последующим осаждением образующихся комплексов КК-фибриллы и измерением поглощения супернатантов при 490 нм (максимум поглощения КК в видимой области).

Результаты. Образование комплексов КК с модельными фибриллами обнаруживали по изменению спектра поглощения КК после инкубации с фибриллами: взаимодействие с фибриллами лизоцима, полноразмерного б2М и ТТР приводило к сдвигу максимума поглощения в длинноволновую область на 10–20 нм и возрастанию интенсивности поглощения; связывание КК с фибриллами б2МΔ6 и б2МΔ10 сопровождалось аналогичным сдвигом максимума поглощения и некоторым снижением интенсивности поглощения по сравнению со свободным красителем. При центрифугировании образцов комплексы КК-фибриллы осаждались в виде красных осадков.

После насыщения фибрилл красителем избыточное количество свободного КК оставалось в супернатантах. По графику зависимости поглощения супернатантов при 490 нм от величины добавленного КК оценивали число молекул красителя, приходящихся на одну молекулу мономера белка в составе фибрилл. Было обнаружено, КК связывался с фибриллами лизоцима в соотношении 5:1 (КК : фибриллы) из расчета на мономер белка, с фибриллами б2М и б2МΔ10 — 4:1, с фибриллами б2МΔ6 — 3:1, с фибриллами ТТР — 4:1 из расчета на субъединицу белка.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованные фибриллы, несмотря на различную приро-

ду составляющих их белков, могут иметь сходное строение и сходным образом взаимодействовать с низкомолекулярными красителями, в частности, КК.

Метод титрования с осаждением нерастворимых комплексов может использоваться для исследования условий и кинетики образования фибрилл различных белков, определения стабильности фибрилл, изучения влияния ингибиторов фибриллогенеза, оценки содержания фибриллярных форм белка в препарате, а также для оценки особенностей взаимодействия гомологов КК с амилоидогенными белками.

Литература

1. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis / Sipe J. D., Benson M. D., Buxbaum J. N., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M. J., Westermark P. // Amyloid.— 2014.— Vol. 21.— P. 221–224.
2. *Klunk W. E., Pettegrew J. W., Abraham J. D.* Quantitative evaluation of Congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation // J. Histochem. Cytochem.— 1989.— Vol. 37(8).— P. 1273–1281.
3. *Klunk W. E., Jacob R. F., Mason R. P.* Quantifying amyloid by Congo red spectral shift assay // Meth. Enzymol.— 1999.— Vol. 309.— P. 285–305.
4. Взаимодействие красителя Конго красный с фибриллами лизоцима, бета2-микроглобулина и транстиретина / Антимонова О. И., Грудинина Н. А., Егоров В. В., Поляков Д. С., Ильин В. В., Шавловский М. М. // Цитология.— 2016.— Т. 58, № 2.— С. 156–163.

МИКРОВЯЗКОСТЬ И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ И ИЗЛУЧЕНИЯ ГАЗОРАЗРЯДНОЙ ПЛАЗМЫ

Е. В. Архипова, И. П. Иванова

Нижегородская государственная медицинская академия, Россия

arhipova@nnovgorod.ru

Введение. Полноценное функционирование иммунокомпетентных клеток зависит от состояния структурных единиц клеточных мембран и их взаимодействия. Основная роль в регуляции мембранных процессов принадлежит микровязкости. Это интегральный показатель, который отражает состояние липидной составляющей мембран, структуру и диффузные функции [1]. Микровязкость легко реагирует на метаболические изменения и внешние воздействия. Процессам перекисного окисления липидов (ПОЛ) придают особое значение в нарушении структуры мембран клеток, что связано с образованием свободных радикалов.

УФ-излучение играет важную роль в жизнедеятельности всех организмов, поэтому его часто используют в биомедицинских исследованиях и лечебных физиотерапевтических процедурах. Известно, что под действием УФ-фотонов с $\lambda<260$ нм образуются радикалы, кислотные остатки, ионы аммония. В последнее время также активно исследуется излучение газоразрядной плазмы, которое является источником радикальных продуктов и оказывает различные биомедицинские эффекты [2, 3]. Поэтому оценка микровязкости и перекисное окисление липидов перитонеальных макрофагов после воздействия УФ-излучения и излучения газоразрядной плазмы достаточно актуально.

Материалы и методы. Эксперименты проведены *in vitro*. Объектом исследования являлись перитонеальные макрофаги крыс линии Wistar. Суспензию макрофагов получали через 20 мин после внутрибрюшинного введения стерильного физиологического раствора. УФ-излучение формировали с использованием ультрафиолетовой лампы ДБК9 (λ=254). Излучение плазмы искрового разряда генерировалось с помощью экспериментального устройства ПИЛИМИН серии ИР-10 (разработано в НИИ ядерной физики им. Д. В. Скобельцына МГУ им. М. В. Ломоносова (Россия) в 2011 г.) с заданными параметрами: длительность импульса — 100 мкс, напряжение источника питания — 11 кВ, емкость импульсного конденсатора — 3,3 нФ, энергия импульса — $5{,}9\times10^{-2}$ Дж, частота — 10 Гц, спектр излучения сплошной с максимумом λ=220 нм. Суспензию перитонеальных макрофагов обрабатывали в течение 30, 60, 300, 600 и 1200 секунд. Контролем служили клетки, не подвергавшиеся воздействию.

Оценку микровязкости мембран макрофагов осуществляли методом регистрации латеральной диффузии гидрофобного зонда пирена. Коэффициент эксимеризации рассчитывали по формуле $К_{экс}=F_{470}/F_{395}$. Спектры флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлюориметра Флюорат 02 Панорама (Россия).

Экстракцию и очистку липидов проводили по методу Folch. Об изменении интенсивности ПОЛ судили по накоплению молекулярных продуктов: диеновых коньюгатов (ДК), триеновых коньюгатов (ТК), малоновому диальдегиду (МДА) и основаниям Шиффа (ОШ).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Excel и Statistica 10.0.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе эксперимента установлено, что излучение плазмы искрового разряда и ультрафиолетовое излучение в течение 600 и 1200 секунд приводят к повышению микровязкости мембран перитонеальных макрофагов в липидном бислое. В области белок-липидных контактов увеличивается микровязкость на 6,92–23,15% при всех режимах воздействия плазмой искрового разряда. Увеличение микровязкости при УФ-излучении на 14,32–23,15% в области белок-липидных контактов

наблюдается при режимах воздействия длительностью 300, 600 и 1200 секунд. Изменение микровязкости мембран зависит от: ненасыщенности липидов, содержания холестерина в мембранах, фосфолипидного состава, количества мембранных белков и процессов окисления макромолекул. Поэтому на следующем этапе эксперимента оценивали интенсивность ПОЛ в перитонеальных макрофагах.

При выбранных режимах обработки излучением газоразрядной плазмы статистически значимо снижается концентрация первичных продуктов ПОЛ — ДК, на 33,71–44,94%. УФ-излучение не приводило к изменению концентрации ДК. Показателем образования вторичных продуктов ПОЛ является накопление ТК и МДА. Установлено снижение концентрации МДА после воздействия излучением газоразрядной плазмы в течение 60 секунд на 21,84%. При режимах воздействия 600 и 1200 секунд наблюдается увеличение количества МДА на 31,76% и 33,50% соответственно. При воздействии УФ-излучением длительностью 1200 секунд установлено накопление МДА на 38,46%. Конечными продуктами ПОЛ являются ОШ. УФ-излучение не оказывает влияния на уровень ОШ. Излучение газоразрядной плазмы длительностью 1200 секунд приводит к снижению уровня ОШ на 22%.

Заключение. После воздействия излучением газоразрядной плазмы и УФ-излучением увеличивается микровязкость мембран макрофагов. Показано, что после воздействия УФ-излучения и излучения газоразрядной плазмы не активируются процессы ПОЛ. Вероятно, в изменении микровязкости мембран макрофагов свободнорадикальные реакции играют второстепенную роль.

Литература

1. Изменение микровязкости мембран лимфоцитов и эритроцитов крови у онкологических больных / Горошинская И. А., Голотина Л. Ю., Горло Е. И., Ровда Т. А., Бордюшков Ю. Н. // Вопросы мед. химии.— 1999.— № 1.— С. 53–57.
2. *Пискарев И. М., Иванова И. П., Трофимова С. В.* Сравнение химических эффектов УФ-излучения искрового разряда на воздухе и ртутной лампы низкого давления // Химия высоких энергий.— 2013.— Т. 47, № 5.— С. 376–380.
3. Анализ активных продуктов излучения плазмы искрового разряда, определяющих биологические эффекты в клетках / Иванова И. П., Трофимова С. В., Карпель Вель Лейтнер Н., Аристова Н. А., Архипова Е. В., Бурхина О. Е., Сысоева В. А., Пискарев И. М. // Соврем. технол. мед.— 2012.— № 2.— С. 20–30.

ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСА *rs1049970* ГЕНА VE-КАДГЕРИНА И УРОВЕНЬ ЕГО БЕЛКОВОГО ПРОДУКТА В КРОВИ ПРИ ТЯЖЕЛОМ ОСЛОЖНЕННОМ ТЕЧЕНИИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

А. А. Байгильдина, О. А. Казамирова

Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Уфа, Россия

baigildinaasia@mail.ru

Введение. Главной мишенью для хантавируса — возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), как и для всех вирусных гемолихорадок, является эндотелий [1, 2]. Такие осложнения этих заболеваний, как инфекционно-токсический шок и ДВС-синдром, напрямую связаны с повышением проницаемости эндотелия и ее дезинтеграцией [3, 4], и в подобных структурно-функциональных изменениях интимы сосудов важную роль играют количественные и качественные изменения экспрессируемого эндотелиоцитами VE-кадгерина [5]. В доступной литературе не обнаружены сведения об изменении содержания этой адгезивной молекулы в крови больных ГЛПС и сведения об ассоциации полиморфных вариантов ее гена с тяжестью течения вирусных гемолихорадок. В этой связи целью исследования явилась оценка динамики концентрации VE-кадгерина в крови больных при тяжелой осложненной форме ГЛПС и исследование ассоциации полиморфного локуса *rs1049970* его гена (VE-cadherin**T1550C*) с тяжестью течения заболевания.

Материалы и методы. Работа одобрена экспертным советом по биомедицинской этике ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. В динамическое наблюдение вовлечены 36 пациентов с серологически подтвержденным диагнозом ГЛПС (32 мужчин и 4 женщины) в возрасте 35,0 [29,0; 47,0] лет, протекающем в тяжелой форме с осложнениями (инфекционно-токсический шок I–II степени, острая почечная недостаточность, ДВС-синдром и др.). Критерием исключения из исследования явилось наличие в анамнезе сердечно-сосудистых, злокачественных и эндокринных заболеваний, болезней печени и почек. Группу контроля составили 23 практически здоровых добровольца, сопоставимых с исследуемой выборкой по полу и возрасту. В молекулярно-генетическом исследовании использованы образцы ДНК 69 больных с серологически подтвержденным диагнозом ГЛПС в возрасте 41,2 [26,7; 51,3] лет, протекающей в осложненной форме, и 171 образец ДНК серонегативного донора. Концентрацию VE-кадгерина в сыворотке крови определяли методом ИФА с использованием тест-системы компании «Bender MedSystems» (Австрия). ДНК из лейкоцитов периферической крови выделяли методом фенольно-хлороформной экстракции. Полиморфный локус *rs1049970* гена VE-кадгерина исследовали методами ПЦР синтеза ДНК и полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. Результаты обработали с использованием стан-

Таблица

Распределение частот генотипов и аллелей, полиморфного локуса *rs1049970* гена VE-кадгерина (VE-cadherinT1550C*) **у больных при тяжелой форме ЕЛПС с осложнениями и серонегативных доноров**

Группы		Генотипы			Аллели	
		*C/*C	*C/*T	*T/*T	*C	*T
Больные	N	24	16	5	64	26
	pi±Sp, C195%	53,33±7,44 (37,87–68,34)	35,56±7,14 (21,87–51,22)	11,11±4,68 (3,71–24,05)	71,11±4,78 (60,60–80,18)	28,89±4,78 (19,75–39,46)
	χ^2 (ρ), df	10,4 (0,006), 2			0,74 (0,38), 1	
	χ^2 (ρ_1), df	12,1 (0,002), 2			0,58 (0,45), 1	
	χ^2 (ρ_2), df	0,66 (0,72), 2			0,01 (0,90), 1	
Серонегативные доноры	n	84	70	2	238	74
	pi±Sp, C195%	53,85±3,99 (45,69–61,85)	44,87±3,98 (36,91–53,03)	1,28±0,90 (0,16–4,55)	76,28±2,41 (71,16–80,89)	23,72±2,41 (19,11–28,84)

дартных статистических пакетов программ Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004), SPSS 13.0 for Windows, «RxC» на основе алгоритма точного двустороннего критерия Фишера Р (F_2). Для оценки количественных показателей уровня VE-кадгерина в крови определяли медиану, интерквартильный интервал (25%; 75%), максимальное и минимальное значения, достоверность межгрупповых различий средних величин оценивали по U критерию Манна-Уитни с поправкой FDR. Взаимосвязь двух количественных признаков оценивали с помощью корреляционного анализа по Спирмену. При попарном сравнении частот генотипов и аллелей в группах больных и в контроле использовали критерий χ^2 Пирсона. Проверку статистических гипотез проводили при критическом уровне значимости ρ=0,05.

Результаты и их обсуждение. В исследуемой группе больных выявлено статистически значимое увеличение частоты минорного генотипа *T/*T (таблица).

Уровень VE-кадгерина в сыворотке крови больных ГЛПС (нг/мл) на всем протяжении болезни статистически значимо ниже контроля (1,07 [1,025; 1,08], ρ<0,02 с поправкой FDR): в период лихорадки —0,61 [0,54; 0,86], (ρ=0,0018), олигурии — 0,75 [0,52; 2,9] (ρ=0,019), полиурии — 0,52 [0,31; 0,61] (ρ=0,01), восстановленного диуреза — 0,34 [0,16; 0,36] (ρ=0,009). Таким образом, при выраженной вирусной нагрузке, имеющей место при тяжелом осложненном течении ГЛПС, наиболее эффективным способом противодействия возбудителю болезни вероятнее всего оказывается эндоцитоз данной адгезивной молекулы, либо снижение ее продукции. Это ведет к ослаблению межэндотелиоцитарных контактов с последующим повышением проницаемости сосудов, что необходимо для успешной экстравазации моноцитов для последующей их трансформацией в макрофаги.

Выводы:

1. Тяжелая форма ГЛПС с осложнениями характеризуется статистически значимо низким уровнем VE-кадгерина в крови больных на всем протяжении болезни.

2. Носительство генотипа *T/*T в полиморфном локусе *rs1049970* гена VE-кадгерина (VE-cadherin**T1550C*) является генетическим фактором предрасположенности к развитию заболевания в тяжелой осложненной форме.

Литература

1. *Peters C. J., Zaki S. R.* Role of endothelium in viral hemorrhagic fevers // Crit. Care Med.— 2002.— Vol. 30 (Suppl 5).— P. 268–273.
2. *Valbuena G., Walker D. H.* The endothelium as a target for infections // Annu. Rev. Pathol.— 2006.— Vol. 1 (1).— P. 171–198.
3. *Feldmann H., Jones S., Klenk H. D., Schnittler H. J.* Ebola virus: from discovery to vaccine // Nat. Rev. Imunol.— 2003.— Vol. 3 (8).— P. 677–685.
4. *Hoenen T., Groseth A., Falzarano D., Feldmann H.* Ebola virus: unravelling pathogenesis to combat a deadly disease // Trends Mol. Med.— 2006.— Vol. 12 (5).— P. 206–215.
5. *Dejana E., Orsenigo F., Lampugnani M. G.* The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability // J. Cell Sci.— 2008.— Vol. 121 (13).— P. 2115–2122.

СОДЕРЖАНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА У НОСИТЕЛЕЙ РАЗНЫХ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПО ПОЛИМОРФНЫМ МАРКЕРАМ ГЕНА *NOS2*

О. В. Балан, Л. В. Топчиева, И. Е. Малышева, В. А. Корнева, К. А. Панкрашова

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия

ovbalan@mail.ru

Введение. Снижение биодоступности оксида азота считают одной из основных причин дисфункции эндотелия, характерной при развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Одним из факторов, определяющих биодоступ-

ность NO является уровень его продукции, в регуляцию которого вовлечены ген *NOS2* и кодируемая им индуцибельная синтаза оксида азота. Данные о возможном влиянии однонуклеотидных замен в различных областях гена *NOS2* на уровень его транскриптов, на активность кодируемого им фермента, а также на содержание метаболитов оксида азота в плазме крови у носителей разных генотипов малочисленны и достаточно противоречивы [1–3].

Целью настоящей работы явилось изучение уровня метаболитов оксида азота у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам гена *NOS2*: rs11080344 (11 интрон), –954G>C (промоторная область), rs3730017 (7 экзон).

Материалы и методы. В качестве материала для исследований использовано 43 образца венозной крови пациентов с диагнозом эссенциальная артериальная гипертензия. Возраст доноров составил — 45,46±2,3. Диагноз ЭАГ был установлен впервые врачами ГБУЗ «Больница скорой медицинской помощи» г. Петрозаводска в ходе диспансеризации. ДНК выделяли с помощью набора AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit («Axygen», США). Генотипирование проводилось методом ПЦР–ПДРФ. Для амлификации участка гена, содержащего rs3730017 использовали праймеры (прямой 5'-CTGGGGTCTTCTGAGTGGG-3'; обратный 5'-TTCTCCCTGGTTTCTCCTG3-'). ПЦР-продукты, содержащие rs3730017 обрабатывали эндонуклеазой рестрикции Mspl (1 е.а) в течение 3 ч при 37° С. Праймеры и условия рестрикции для генотипирования по маркерам –954G>C, rs11080344 описаны ранее [2, 4]. Определение уровня метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитритов и нитратов) в плазме крови проводили по методу Метельской В. А. [5]. Достоверность различий в содержании метаболитов NO между группами оценивали с помощью непараметрического критерия U Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при значении p<0,05. Исследования выполнены на оборудовании ЦКП ИБ КарНЦ РАН.

Результаты исследований. Показано, что содержание метаболитов оксида азота у носителей CC, CT и TT генотипов по полиморфному маркеру гена *NOS2* (rs11080344) достоверно не различалось. Аналогичные данные получены и при сравнении NO_x у носителей GG и GC+CC генотипов по –954G>C полиморфному маркеру гена *NOS2* (таблица). По данным литературы, замена гуанина на цитозин в -954 позиции промотора гена *NOS2* может способствовать повышению активности кодируемого им фермента [2]. Тем не менее, в нашем исследовании мы не обнаружили различий в содержании нитритов и нитратов у носителей разных генотипов по указанному маркеру. Отсутствие различий в содержании NO_x у здоровых людей и больных туберкулезом, имеющих разные генотипы по –954G>C маркеру гена *NOS2* также было показано в работе Leandro с соавторами [3]. Уровень метаболитов оксида азота в плазме крови доноров, имеющих генотип CC по маркеру гена *NOS2* (rs3730017) был почти в два раза ниже по сравнению с носителями TC+TT генотипов (таблица). Однофакторный дисперсионный анализ с использованием критерия Краскела-Уоллиса позволил выявить влияние данного полиморфизма на содержание нитритов и нитратов в плазме крови (H=8,99; p=0,0027).

Таблица

Содержание метаболитов оксида азота (NO_x) в плазме крови носителей разных генотипов по полиморфным маркерам гена *NOS2*

Маркер	rs11080344			–954G>C		rs3730017	
Генотипы	CC (n=9)	CT (n=10)	TT (n=8)	GG (n=11)	GC+CC (n=8)	CC (n=35)	TC+TT (n=18)
Содержание NO_x, мкМ/мл	10,25±1,7	10,65±3,32	6,6±0,34	6,29±1,23	10,6±1,83	12,89±1,75	21,4±2,97
p		0,65	0,35		0,063		0,001*

Примечание: *Достоверные различия по сравнению с CC генотипом по *rs3730017*.

Выводы. Уровень NO_x в плазме крови достоверно выше у носителей TC+TT генотипов по rs3730017 полиморфному маркеру гена *NOS2*.

Литература

1. NOS2 polymorphisms associated with the susceptibility to pulmonary arterial hypertension with systemic sclerosis: contribution to the transcriptional activity / Kawaguchi Y., Tochimoto A., Hara M., Kawamoto M., Sugiura T., Katsumata Y., Okada J., Kondo H., Okubo M., Kamatani N. // Arthritis Research & Therapy.— 2006.— Vol. 8.— P. 104 (doi:10.1186/ar1984).
2. Nitric oxide synthase 2Lambarĕně(G-954C), increased nitric oxide production and protection against malaria / Kun J.F., Mordmüller B., Perkins D.J., May J., Mercereau-Puijalon O., Alpers M., Weinberg J. B., Kremsner P. G. // The Journal of infectious diseases.— 2001.— Vol. 184. P. 330–336.
3. No association of IFNG+874T/A SNP and NOS2A-954G/C SNP variants with nitric oxide radical serum levels or susceptibility to tuberculosis in a brazilian population subset / Leandro A.C.C.S., Rocha M.A., Lamoglia-Souza A., Vande Berg J. L., Rolla V. C., Bonecini-AlmedavMda G. // BioMed Research International.— 2013.— Article ID 901740, 7 pages. URL: http://dx.doi.org/10.1155/2013/901740.
4. *Nanashima K., Mawatari T., Tahara N.* Genetic variants in antioxidant pathway: risk factors for hepatotoxicity in tuberculosis patients // Tuberculosis (Edinb). — 2012.— Vol. 92.— P. 253–259. doi: 10.1016/j.tube.2011. 12.004.
5. *Метельская В. А., Гуманова Н. Г.* Скрининг-метод определение уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови // Клиническая лабораторная диагностика.— 2005.— № 6.— С. 15–18.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЦИНКА НА ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ЛИПИДНЫХ РАФТОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Ю. М. Гармаза
Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
garmaza@yandex.ru

Ранее нами показано, что 2-х часовое воздействие сульфата цинка в фармакологических и токсичных концентрациях на эритроциты человека *in vitro* приводит к 20–30% аккумуляции в них Zn^{2+}, что сопровождалось увеличением уровня свободных SH- и NH_2-групп на поверхности их мембран, а также модификацией физического состояния фосфолипидов и латерального распределения мембранного холестерина. Так как выяснилось, что это играет важную роль в функционировании белков-транспортеров семейства MRP в эритроцитах, была выдвинута гипотеза, что одним из возможных механизмов обнаруженных Zn-индуцированных изменений является нарушение структуры и функции специализированных гликолипидных микродоменов или липидных рафтов [1]. Как известно, эти холестерол- и сфинголипид-обогащенные мембранные домены в ассоциации со специфическими мембранными белками (флоттилины, стоматины, G-белки) играют важную роль в таких процессах, как сортинг белков и построение сигнальных комплексов, а также центральную роль в процессах клеточной сигнализации (напр.: апоптоз) [2].

Цель работы — проверка гипотезы, что одним из механизмов Zn-индуцированных изменений мембран эритроцитов является модификация липидных рафтов.

Материалы и методы исследования. В работе использована кровь здоровых доноров в консерванте «гепарин». Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 1500 g в течение 10 мин и трижды отмывали в 155 мМ NaCl. Нагрузку эритроцитов ионами цинка проводили путем инкубации суспензии клеток с сульфатом цинка в фармакологической (50 мкМ) и токсичной (500 мкМ) концентрациях в 10 мМ трис-HCl буфере, содержащем 155 мМ NaCl, pH 7,4 (2 ч, 37° C). Липидные рафты или изолированные из эритроцитарных мембран детергент-резистентные участки мембран (DRMs) были экстрагированы из цельных эритроцитов до и после нагрузки их ионами цинка в градиенте сахарозы в 5 мМ HEPES буфере, содержащем 150 мМ KCl, 8 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$, pH 7.4 с добавлением 1%-го тритона X-100 и подвержены центрифугированию 225 000 g при 4оС в течение 16 ч. После ультрацентрифугирования суспензия эритроцитов разделялась на 6 фракций, которые были собраны по 1 мл и подвержены дальнейшему анализу. Стоит отметить, что именно 2-я фракция представляет собой DRMs [3]. Оценку модификации DRMs проводили по анализу следующих мембранносвязанных белков: флоттилин-2, стоматин, белок полосы 3, с помощью методов электрофореза в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинга с применением специфических антител: моноклональные антитела мыши анти-флоттилин-2 (BD, разведение 1:2000), моноклональные антитела кролика анти-стоматин (H-49) (SC, 1:1000), моноклональные антитела мыши анти-B3 (Sigma, 1:15 000). Связывание первичных антител оценивалось после инкубации со вторичными антителами (антитела против IgG мыши или кролика, соответственно, 1:15 000), конъюгированными с пероксидазой хрена, с последующей хемилюминесцентной детекцией.

Результаты и их обсуждение. После проведения ультрацентрифугирования суспензии интактных и Zn-нагруженных эритроцитов не обнаружено видимых различий в количестве полос DRMs и степени их упаковки до и после воздействия ионов цинка. Таким образом, можно заключить, что взаимодействие Zn^{2+} с мембранами эритроцитов не оказывает влияния на уровень мембранного холестерина и/или сфинголипида (как основных рафтовых липидов).

На следующем этапе работы изучены локализация и количество как белков-маркеров DRMs (флоттилин-2 и стоматин) [2], так и нерафтовых белков — белка полосы 3, в каждой изолированной фракции. Было показано, что белок-маркер DRM — флоттилин-2 (47 кДа), находится только во фракции липидных рафтов, в то время, как во фракциях 3–6 он не обнаружен ни в контрольных образцах, ни в образцах, подвергшихся воздействию Zn^{2+}. При этом плотность белка и его локализация не зависела от концентрации Zn^{2+} в среде инкубации и отличий от контрольных образцов обнаружено не было. В то же время, были обнаружены различия в количестве и локализации другого белка-маркера DRM — стоматина (32 кДа). В образцах, подвергшихся воздействию Zn^{2+} в исследуемых концентрациях, белок был обнаружен также в нерафтовых фракциях, чего не наблюдалось в образцах интактных клеток, а плотность полосы белка в рафтовой зоне была выше, по сравнению с интактными клетками.

Как известно, одним из участников активного транспорта может быть основной интегральный белок мембраны эритроцитов — белок полосы 3, важнейшей функцией которого является транспорт анионов через плазматическую мембрану. Ранее было установлено, что Zn^{2+} в концентрации 50 мкМ индуцирует конформационные изменения в цитоплазматическом домене белка полосы 3, которые, в свою очередь, передаются мембранному домену, в результате чего происходит ингибирование его анион-транспортной активности. Используя метод вестерн-блоттинга, было отмечено уменьшение количества белка полосы 3 в рафтовой зоне клеток, подвергшихся воздействию Zn^{2+} по сравнению с контрольными образцами.

Заключение. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что ионы цинка в фармакологических или токсичных концентрациях не оказывают видимого влияния на количество и степень упаковки DRMs, с одной стороны, но в то же время модифицируют их структуру (изменяя локализацию как белка-маркера DRM — стоматина, так и интегрального белка–белка полосы 3).

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда Карипло, организованного центром Ландау-Вольта.

Литература

1. *Гармаза Ю. М., Слобожанина Е. И.* Эссенциальность и токсичность цинка. Биофизические аспекты // Биофизика.— 2014.— Т. 59, Вып. 2.— С. 322–337.
2. *Петрович В. А., Слобожанина Е. И.* Липидные рафты в биологических мембранах // Новости медико-биологических наук.— 2013.— Т. 7, № 1.— С. 69–75.
3. *Ciana A., Achilli C., Balduini C., Minetti G.* On the association of lipid rafts to the spectrin skeleton in human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.— 2011.— Vol. 1808.— P. 183–190.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПОЛНОГЕНОМНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ CCGG САЙТОВ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНОГО ТИПА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ БИСФЕНОЛОМ А

Н. И. Дергачева, И. О. Сучкова, Л. К. Сасина
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

natalia-9999@mail.ru

Введение. Метилирование ДНК является одним из эпигенетических механизмов регуляции активности генов и играет важную роль во многих биологических процессах, которые могут нарушаться под воздействием различных эпигеномных токсинов, в том числе бисфенола А (БФА). БФА обладает сильно выраженной эстрогенной активностью, повышает частоту хромосомных аберраций в гаметах, способен изменять профиль метилирования многих генов в эмбриогенезе и во взрослом состоянии, вследствие чего может возникать нарушение репродуктивной функции, а также повышаться риск развития ожирения, диабета, сердечно-сосудистых патологий и др. [1, 2]. В связи с этим является актуальным изучение характера влияния БФА на метилирование ДНК в клеточных линиях человека различного типа.

Цель данной работы состояла в оценке уровня полногеномного метилирования ДНК в четырех клеточных линиях человека, культивируемых в присутствии различных концентраций БФА.

Материалы и методы. Анализ метилирования ДНК был проведен на культурах клеток человека различного происхождения: Hek-293(клетки почки эмбриона), HepG2 (карцинома печени), IMR-32 (нейробластома), FetMSC (мезенхимальные стволовые клетки костного мозга 5–6 недельного эмбриона) [3]. Клетки культивировались во флаконах 25 см^2 в среде DMEM (DMEM/F12 для FetMSC) с эмбриональной бычьей сывороткой в течение суток, затем еще 72 часа в присутствии БФА (конечные концентрации 0,25 mkM, 0,5 mkM, 1 mkM, 10 mkM) на 0,02% DMSO. Каждый эксперимент повторяли трижды. Геномную ДНК выделяли стандартным хлороформным методом. Ферментативный гидролиз ДНК проводили с помощью метил-чувствительных эндонуклеаз рестрикции MspI и HpaII, следуя рекомендациям фирмы-производителя («Thermo Scientific»). Для одного и того же исследуемого образца ДНК в опыт брали три варианта: с MspI, с HpaII и без добавления ферментов. После ферментативного гидролиза ДНК проводили электрофорез в 1%-м агарозном геле на 0,5^{x}TBE (50 минут, 40 mA). ДНК визуализировали окрашиванием бромистым этидием (1 мкг/мл) в течение 15 минут. Гель фотографировали. Количественный анализ полученных изображений электрофореграмм проводили при помощи программы ImageJ. На основе стандартной прямой устанавливали относительный уровень полногеномного метилирования CCGG сайтов для исследуемых образцов [4]. Стандартом служили образцы коммерческой неметилированной и метилированной ДНК человека («Zymo-Research»). Статистическую обработку данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественного сравнения с контрольной группой.

Результаты. Обнаружено, что исследуемые культуры клеток в норме различаются по уровню полногеномного метилирования ДНК в CCGG сайтах и по-разному реагируют на присутствие БФА в питательной среде в зависимости от концентрации токсиканта (таблица).

Повышение уровня метилирования ДНК наблюдалось при 0,25 мкМ БФА (для HepG2 и IMR32), при 0,5 мкМ БФА (для Hek293) и при 10 мкМ БФА (для HepG2 и FetMSC), а снижение уровня метилирования было обнаружено только для одной клеточной линии (Hek293) при 0,25 мкМ, 1 мкМ и 10 мкМ БФА. При этом для клеточных линий Hek293 и HepG2 обнаружены колебания изменения метилирования ДНК в зависимости от концентрации БФА в питательной среде. Так, для Hek293 наблюдались переходы от гипометилирования (при 0.25 мкМ БФА) к гиперметилированию (при 0,5 мкМ БФА) и затем опять к гипометилированию (при 1 мкМ и 10 мкМ БФА). Для линии HepG2, наоборот, при 0,25 мкМ БФА выявлено повышение метилирования, при 0,5 мкМ и 1 мкМ БФА метилирование ДНК находится на уровне контроля, а при 10 мкМ БФА опять наблюдается повышение полногеномного уровня метилирования ДНК.

Заключение. Результаты нашего исследования указывают на влияние как высоких, так и низких доз БФА на эпигеном. Наблюдаемые изменения уровня полногеномного метилирования ДНК зависят не только от концентрации токсиканта, но и от типа клеток человека. Клетки нейронального (IMR-32) и гепацитарного (HepG2) типа более чувстви-

Таблица

Относительный уровень полногеномного метилирования CCGG сайтов в ДНК клеточных линий человека при интоксикации бисфенолом А в течение 72 часов

Группа	Метилирование ДНК (% ± std.err)			
	Hek-293	HepG2	IMR32	FetMSC
Контроль	48,52±2,47	30,51±0,01	34,75±2,88	32,21±1,56
0,25 мкМ БФА	27,97±0,34*	46,83±0,64*	57,34±1,99*	39,83±1,56
0,5 мкМ БФА	56,78±1,56*	31,36±1,56	31,36±6,78	35,60±1,56
1 мкМ БФА	32,07±1,50*	30,94±2,97	31,36±0,43	36,02±1,56
10 мкМ БФА	25,43±1,56*	44,28±1,56*	32,42±1,06	53,81±1,56*

* — статистически значимые различия с контрольной группой при $p < 0,05$

тельны к низким дозам БФА (наблюдалось гиперметилирование), тогда как эмбриональные стволовые клетки костного мозга (FetMSC) к этим концентрациям более устойчивы и реагируют только на более высокую концентрацию БФА. В то же время эмбриональные клетки почки (Hek-293) чувствительны ко всем исследуемым концентрациям.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-04642а.

Литература

1. *Паткин Е. Л., Софронов Г. А.* Эпигенетика популяций, экотоксикогенетика и болезни человека // Экологическая генетика.— 2012.— № 4.— С. 14–28.
2. *Mileva G., Baker S. L., Konkle A. T. M., Bielajew C.* Bisphenol-A: epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior // Int. J. Environ. Res. Public Health.— 2014.— Vol. 11, № 7. P. 7537–7561.
3. www.cytspb.rssi.ru
4. Количественное определение полногеномного метилирования ДНК с помощью метил-чувствительной рестрикции и IMAGEJ анализа (MSR-IA) / Сучкова И. О., Дергачева Н. И., Павлинова Л. И., Сасина Л. К., Баранова Т. В., Паткин Е. Л. // Международный научно-исследовательский журнал.— 2016.— № 4 (46) (часть 5).— С. 41–46.

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ENDOG И КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ В НОРМЕ И ПРИ АПОПТОЗЕ

[1,2]Д. Д. Жданов, [2]Д. А. Васина, [2]В. С. Орлова, [1]М. В. Покровская, [1]С. С. Александрова , [1]Н. Н. Соколов
[1]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия
[2]Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

zhdanovdd@mail.ru

Теломераза синтезирует теломерные повторы на концах хромосом, что позволяет клеткам с активной теломеразой поддерживать длину теломер на уровне достаточном для неограниченной пролиферации [1]. Активность теломеразы регулируется процессом альтернативного сплайсинга мРНК ее каталитической субъединицы hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase). Делеция 36 нуклеотидов в экзоне 6 (α-вариант) и делеция 182 нуклеотидов экзонов 7 и 8 (β-вариант) приводит к синтезу укороченных форм hTERT с редуцированной активностью [2]. В настоящее время механизм сплайсинга hTERT изучен недостаточно полно. Известно, что апоптотическая эндонуклеаза EndoG принимает участие в данном процессе. В норме EndoG локализуется в митохондриях и интернализуется в ядро только при развитии апоптотических процессов [3]. Поэтому вопрос о ко-локализации EndoG и hTERT в клетке, а также локализации процесса сплайсинга hTERT является актуальным.

Целью работы явилось изучение внутриклеточной локализации и экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT в норме и при апоптозе клеток.

Материалы и методы. Для индукции апоптоза клетки карциномы кишечника человека CaCo-2 культивировали в присутствии цисплатина. ОТ-ПЦР в реальном времени и метод Вестерн блоттинга применяли для изучения экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT. Оценку активности теломеразы проводили методом TRAP (Telomeric Repeats Amplification Protocol). Методом иммуноцитохимии оценивали внутриклеточную локализацию EndoG и hTERT.

Результаты и их обсуждение. В клетках инкубированных с цисплатином, обнаружено увеличение экспрессии EndoG, достоверное снижение экспрессии полноразмерного α+β+сплайс-варианта hTERT, а также достоверное увеличение экспрессии α+β-сплайс-варианта hTERT. Апоптоз, индуцированный цисплатином, не приводил к изменению экспрессии α-β+ и α-β-сплайс-вариантов

hTERT. Активность теломеразы в апоптотических клетках достоверно понижалась. Не обнаружено различия между уровнями экспрессии EndoG в цитоплазме и ядрах нормальных клеток. Достоверное увеличение экспрессии наблюдалось как в цитоплазме, так и в ядрах клеток инкубированных с цисплатином. Не выявлено достоверной разницы между уровнями экспрессии полноразмерного α+β+сплайс-варианта hTERT в цитоплазме и ядрах нормальных клеток. Достоверное снижение экспрессии данного сплайс-варианта как в цитоплазме, так и в ядре наблюдали при инкубации клеток с цисплатином. Интересен тот факт, что не удалось обнаружить экспрессии α+β-сплайс-варианта hTERT в ядрах нормальных клеток, в то время как в цитоплазме экспрессия данного варианта была достаточно высокой. Инкубация клеток с цисплатином приводила к достоверному повышению экспрессии α+β-сплайс-варианта hTERT в цитоплазме и появлению его экспрессии в ядрах. Результаты вестерн-блоттинга показали, что в цитоплазме апоптотических клеток количество полноразмерного α+β+варианта hTERT достоверно увеличивается, а количество α+β-варианта hTERT снижается. Теломеразная активность в цитоплазме нормальных клетках составляет около 30% от общей теломеразной активности клетки. При инкубации клеток с цисплатином происходило достоверное снижение активности теломеразы в цитоплазме до уровня 20%. Инкубация клеток с цисплатином приводила к достоверному увеличению в ядрах количества EndoG и понижению количества полноразмерного α+β+сплайс-варианта hTERT. Несмотря на отсутствие экспрессии α+β-сплайс-варианта hTERT в ядрах нормальных клеток, мы обнаружили его присутствие методом вестерн блоттинга. Инкубация клеток с цисплатином приводила к достоверному снижению количества α+β+ и увеличению α+β-белков сплайс-варианта hTERT. Активность теломеразы в ядрах нормальных клеток составила около 75% от общей теломеразной активности клетки. При инкубации клеток с цисплатином происходило достоверное снижение активности теломеразы в цитоплазме до уровня 15%. Обратный эффект действия цисплатина на количество EndoG и сплайс-вариантов hTERT наблюдался в митохондриях. Развитие процессов апоптоза приводило к достоверному понижению количества EndoG, увеличению количества полноразмерного α+β+ и уменьшению α+β-сплайс-варианта hTERT. Мы обнаружили активность в митохондриях нормальных клеток на уровне около 10% от общей теломеразной активности клетки. При инкубации клеток с цисплатином достоверного изменения активности теломеразы в митохондриях не обнаружено. Для выявления степени внутриклеточной ко-локализации EndoG и hTERT был проведен ее анализ при помощи алгоритмов Пирсона и Мандерса. Полученные данные указывают на высокую степень ко-локализации EndoG и hTERT в нормальных клетках по критерию Мандерса. Степень ко-локализации достоверно увеличивалась в апоптотических клетках при инкубации с цисплатином. Пиксельный анализ по критерию Пирсона также позволяет говорить о высокой степени ко-локализации EndoG и hTERT в нормальных (P=0,77) и апоптотических клетках (P=0,86).

Выводы. В соответствии с полученными данными, в нормальных клетках EndoG присутствует преимущественно в цитоплазме и митохондриях. В апоптотических клетках EndoG локализуется главным образом в ядрах. Большая часть каталитической субъединицы теломеразы hTERT в нормальных клетках локализуется в ядрах, однако, мы обнаружили hTERT также и в митохондриях. Не установлено значительного внутриклеточного перераспределения hTERT в апоптотических клетках.

Литература

1. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer / Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., Shay J. W. // Science.— 1994.— Vol. 266.— P. 2011–2015.
2. Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium / Ulaner G. A., Hu J. F., Vu T. H., Oruganti H., Giudice L. C., Hoffman A. R. // International Journal of Cancer.— 2000.— Vol. 85.— P. 330–335.
3. Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space / Ohsato T., Ishihara N., Muta T., Umeda S., Ikeda S., Mihara K., Hamasaki N., Kang D. // European Journal of Biochemistry.— 2002.— Vol. 269.— P. 5765–5770.

ВЫБОР ПРОМОТОРА ДЛЯ АСТРОЦИТСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В ГОЛОВНОЙ МОЗГ КРЫСЫ *IN VIVO* МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ

[2,3]С. Н. Зобова, [1]Д. А. Молотков, [1]Л. С. Хируг

[1]Хельсинкский университет, Финляндия

[2]Красноярская государственная медицинская академия им. В. Ф. Войно-Ясенецкого, Россия

[3]Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия

SNZobova@yandex.ru

Введение. Доставка генетического материала методом электропорации, основанным на электро-опосредованном переносе нуклеиновых кислот, является хорошей альтернативой длительному и трудоёмкому созданию трансгенных животных или изготовлению вирусных векторов. Хотя механизм проникновения нуклеиновых кислот в клетку при электропорации до конца не изучен, данный подход нашёл широкое применение в исследованиях ЦНС [1]. Метод существу-

ет в двух основных модификациях. Электропорация *in utero*, выполняемая на 14–16 день внутриутробного периода, предназначена для доставки генетического материала в клетки нейрональных предшественников, способных к делению и миграции, и не эффективна в отношении астроглии [2]. Второй подход, применяемый на различных стадиях постнатального развития, осуществляется с помощью стереотаксического манипулятора и имеет ряд преимуществ, обеспечивая возможность доставки генетического материала в пространственно разделённые участки, соответствующие стереотаксическим координатам, и позволяя преодолеть онтогенетические компенсаторные механизмы, включающиеся при переносе экзогенных генов. Недостатком метода является преимущественная трансдукция клеток субвентрикулярной зоны [3].

Цель исследования. Обеспечить постнатальную доставку генетического материала *in vivo* в клетки, располагающиеся вне субвентрикулярной зоны, в частности, в кортикальные астроциты, и достичь его эффективной и специфичной экспрессии.

Материалы и методы. В эксперименте были использованы 0–4-дневные крысята Wistar. Используя EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein — усиленный зелёный флюоресцирующий белок) в качестве репортерного гена [4], мы модифицировали технику постнатальной электропорации. Было установлено, что быстрая инъекция (в течение 10 с) небольшого объёма (50 нл) высоко концентрированной плазмиды (3 мкг/мкл) через заточенный боросиликатный капилляр с диаметром острия 20–30 мкм с последующим немедленным нанесением 5 прямоугольных электрических импульсов (50 мс, 1 Гц, 120 В/см) посредством пинцетообразных электродов, размещённых непосредственно на поверхности черепа и снабжённых электропроводящим гелем, приводит к формированию отчётливого паттерна экспрессии EGFP в клетках коры и стриатума. Показано также, что 1–2 день постнатального развития является оптимальным возрастным интервалом для проведения *in vivo* электропорации вследствие относительно низкого содержания миелина и неоконченного формирования черепных костей, а также хорошей переносимости изофлюрановой анестезии.

Результаты и их обсуждение. Экспрессия генетического материала в конкретных субпопуляциях клеток как в экспериментах *in vitro*, так и при создании трансгенных животных эффективно достигается использованием специфического промотора, однако при доставке плазмидной ДНК без посредства трансфецирующих агентов данный подход может встретить серьёзные ограничения. Мы показали, что при использовании неспецифического промотора CAG (гибридный конструкт, представляющий собой промотор куриного β-актина с цитомегаловирусным энхансером) экспрессия репортерного гена с высокой эффективностью отмечалась в клетках, имеющих морфологию астроцитов. Высокая и стабильная экспрессия EGFP в кортикальных и гиппокампальных астроцитах, а также в клетках радиальной глии регистрировалась в течение нескольких недель с момента проведения постнатальной электропорации. Вместе с тем, специфичный для астроцитов мышиный GFAP промотор длиной 1,7 тысяч пар нуклеотидов (Glial Fibrillary Acidic Protein — глиальный фибриллярный кислый белок), доставленный методом *in vivo* электропорации в неонатальный кортекс, вызывал экспрессию репортерного гена в клетках с морфологией нейронов и радиальной глии. Изменение экспрессионных характеристик mGFAP промотора могут быть обусловлены бактериальным паттерном метилирования плазмидной ДНК, отличающимся от эукариотического паттерна. Универсальный CMV промотор — ранний промотор цитомегаловируса человека, не был эффективен при доставке плазмиды, содержащей репортерный ген, методом *in vivo* электропорации.

Выводы. Приведённые результаты показывают, что выбор адекватного промотора является критической ступенью для успешного проведения in vivo электропорации, а также указывают на возможность использования данного метода с целью изучения регуляторных элементов влияющих на генную экспрессию, а также эффектов их эпигенетической модификации.

Литература

1. *In vivo* electroporation of the central nervous system: a non-viral approach for targeted gene delivery / De Vry J., Martínez-Martínez P., Losen M., Temel Y., Steckler T., Steinbusch H. W. M., De Baets M. H., Prickaerts J. // Prog. Neurobiol.— 2010.— Vol. 92.— P. 227–44.
2. *In vivo* electroporation in the embryonic mouse central nervous system / Saito T. // Nat. Protoc.— 2006.— Vol. 1 — P. 1552–8.
3. In vivo reprogramming of circuit connectivity in postmitotic neocortical neurons / De la Rossa A., Bellone C., Golding B., Vitali I., Moss J., Toni N., Lüscher C., Jabaudon D. // Nat. Neurosci.— 2013.— Vol. 16.— P. 193–200.
4. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro / Matsuda T., Cepko C. L. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.— 2004.— Vol. 101.— P. 16–22.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ И ЦИТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА РЯДА АНАЛОГОВ ЭСТРОГЕНОВ *IN VITRO*

[1,2]И. И.Зорина, [2]О. В. Галкина, [2]Н. Д. Ещенко

[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

[2]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

zorina.inna.spb@gmail.com

К настоящему времени накоплено множество данных о широком спектре биологических свойств различных гормонов, в частности эстрогенов (Е). Они участвуют в работе мочеполовой, сердечнососудистой, опорной

и нервной систем. Установлено, что Е проявляют цито- и нейропротекторные эффекты [1]. Аналоги Е широко используются в медицине. Однако их длительное применение обнаруживает множество побочных эффектов, в том числе и канцерогенный [2]. С другой стороны, Е проявляют различные защитные свойства при нейродегенеративных заболеваниях, данные проявления могут быть опосредованы, в том числе и антиоксидантной активностью этих гормонов. В связи с этим становится актуальной проблема поиска и создания препаратов нового поколения на основе Е, не вызывающих побочных эффектов такого рода с рядом положительных свойств. Обнаруживаемая Е защита может быть обусловлена как геномными, так и негеномными механизмами. Антиоксидантная и антирадикальная активность (АОА, АРА) в большинстве случаев не опосредованы активацией рецепторов, а обусловлены в большей мере структурой молекулы. В зависимости от химической структуры и концентрации эстрогены и их аналоги могут обладать различной про- и антиоксидантной активностью.

Цель работы: изучение возможных антиоксидантных и цитопротекторных свойств аналогов Е: 17α-этинилэстрадиол (ЕЕ); соединение № 1: 3-гидрокси-7α-метил-6-окса-8α-эстра-1,3,5(10)-триен-17-он; соединение № 2: 3,17β-дигдрокси-7α-метил-6-окса-8α-эстра-1,3,5(10)-триен.

За стандарт в нашей работе были приняты такие классические антиоксиданты, как ионол и тролокс (водорастворимый аналог витамина Е). 17α-этинилэстрадиол, как используемый в клинике, выступал в качестве препарата сравнения. Нами было проведено определение собственной АРА аналогов Е в системе с использованием стабильного липофильного радикала α,α-дифенил-β-пикрилгидразила (ДФПГ) [3]. Так было выявлено, что все исследованные аналоги в концентрации 1 мМ и 10 мкМ обладают АРА *in vitro*, но в разной степени. Только соединение № 1 в обеих концентрациях достоверно проявляет в среднем в 1,3 раза более выраженную АРА, чем классический антиоксидант ионол.

В ходе исследования антиоксидантной емкости с помощью ORAC-теста [3] было обнаружено, что оба соединения в диапазоне концентраций 3,125 мкМ — 25 мкМ *in vitro* обладали сравнимой с тролоксом антиоксидантной емкостью.

Также на культуре клеток феохромоцитомы человека PC12, проявляющей нейрональные свойства, проводилась оценка цитопротекторных свойств аналогов Е при индукции окислительного повреждения добавлением 0,3 мМ H_2O_2. Уровень цитотоксичности оценивался по активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в супернатанте разрушенных клеток и вычислялся в процентах [4]. Выявление способности влиять на генерацию активных форм кислорода (АФК) измерялась по уровню флуоресценции 2`,7`-дихлорофлуоресцеина в тех же условиях. Клетки были преинкубированы с соединениями в концентрации 10 мкМ и 50 мкМ в течение 1 ч, а затем проводилась 2-х часовая коинкубация клеток с 0,3 мМ H_2O_2 [4]. Препараты растворялись в 5%-м растворе ДМСО, который не оказывал влияния на исследуемые параметры.

В ходе исследования было показано, что соединения № 1 и № 2 обладают цитопротекторными свойствами и способны снижать генерацию АФК при добавлении H_2O_2. Инкубация с ЕЕ и соединением № 1 достоверно снижала выход ЛДГ из клеток: активность фермента соответственно составила 9,77±0,06% и 9,15±1,58% по сравнению с клетками, инкубированными только в присутствии H_2O_2 (20,67±1,26 %). Соединение № 2 также проявляло защитные свойства, но менее выражено. Также полученные данные свидетельствуют о том, что ЕЕ, соединения № 1 и № 2 эффективно снижают генерацию АФК в клетках линии PC12 в обеих исследованных концентрациях. Соединение № 1 оказало более ингибирующее действие на генерацию АФК, чем соединение № 2.

Мы предполагаем, что наличие гидроксильной группы при С17 соединения № 2 может затруднять проникновение молекулы сквозь липидный бислой за счет повышения ее гидрофильности. Увеличение гидрофобности молекул — одна из стратегий синтеза аналогов Е, позволяющей соединению проявлять АОА как в качестве ловушки АФК, так и структурного антиоксиданта [2]. Важно подчеркнуть, что соединения сами по себе не вызывают генерацию АФК в клетках линии PC12. Проявленный цитопротекторный эффект может быть опосредован АОА данных соединений, которая была обнаружена нами.

Выявленные в ходе работы антиоксидантные и цитопротекторные свойства аналогов эстрогенов представляют особый интерес для поиска терапевтических подходов при лечении различных нейродегенеративных заболеваний, что открывает дальнейшие перспективы для их исследования.

Литература

1. *Manthey D., Behl C.* From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen // Neuroscience.— 2006.— Т. 138.— С. 845–50.
2. Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention / Cavalieri E., Chakravarti D., Guttenplan J., Hart E., Ingle J., Jankowiak R., Muti P., Rogan E., Russo J., Santen R., Sutter T. // Biochim. Biophys. Acta.— 2006.— Т. 1766, № 1.— С. 63–78.
3. *Prior R. L., Wu X., Schaich K.* Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements // Journal of agricultural and food chemistry.— 2005.— Т. 53, № 10.— С. 4290–4302.
4. GM1 ganglioside activates ERK1/2 and Akt downstream of Trk tyrosine kinase and protects PC12 cells against hydrogen peroxide toxicity / Zakharova I. O., Sokolova T. V., Vlasova Y. A., Furaev V. V., Rychkova M. P., Avrova N. F. // Neurochemical research.— 2014.— Т. 39, № 11.— С. 2262–2275.

ЭКТОПИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО В КРОВОТОКЕ КРЫС С ХРОНИЧЕСКИМ ДЕФИЦИТОМ ПЕЧЕНОЧНОГО ХОЛО-ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА

Е. Ю. Ильичева, Л. А. Канаш, Н. А. Рожкова, З. Р. Тимирова
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Россия

ikaterina2705@yandex.ru

Введение. Медь, одновременно токсичный и необходимый для выживания всех организмов микроэлемент, входит в состав жизненно важных ферментов и, как вторичный мессенджер, участвует в регуляции клеточного цикла и апоптоза [1]. В органах безопасный метаболизм меди осуществляется автономно на клеточном уровне. Баланс меди в целом организме контролирует печень, ответственная за статус меди в крови, который определяется содержанием холо-церулоплазмина (холо-ЦП, мультимедной ферр(оксидазы), передающей медь в клетки негепатоцитарных рядов [1]), концентрациями иммунореактивного ЦП и общей меди. Органы и ткани, развитие которых зависит от увеличения потребления меди, стимулируют метаболизм меди в печени, в результате повышаются показатели статуса меди и орган извлекает ее из кровотока [2, 3]. Ранее мы показали, что у крыс с хроническим дефицитом холо-ЦП, вызванным добавлением в корм AgCl в течение 6 месяцев, в кровотоке появляется холо-ЦП не печеночного происхождения [4].

Целью данного исследования было найти орган, который компенсирует хронический дефицит холо-ЦП.

Материалы и методы. Работа выполнена на крысах, родившихся в виварии ФГБНУ «ИЭМ» от самок, полученных из питомника «Рапполово». Экспериментальные животные были вскормлены самками, которые с первого дня лактации получали с кормом AgCl (50 мг/кг массы тела), а с 23-го дня жизни до 6-месячного возраста продолжали получать Ag-корм. Выделение субклеточных фракций, ОТ-ПЦР анализ, иммуноблотинг, определение активности ферментов, измерение концентрации металлов, статистическую обработку результатов проводили, как описано ранее [4]. При планировании работы мы исходили из того, что орган (органы), компенсирующий дефицит печеночного холо-ЦП, должен удовлетворять, по меньшей мере, двум критериям: не накапливать серебро, чтобы оно конкурентно не включалось в молекулу ЦП, и экспрессировать ген ЦП. В организме Ag-крыс, как показали прямые измерения, печень, селезенка и легкие лидировали по удельному содержанию серебра. В мышцах, мозге, внутреннем и подкожном жире (ВЖ и ПЖ, соответственно) обнаружено наименьшее количество серебра. В группу органов Ag-крыс, в которых определяли активность гена ЦП, были включены ВЖ и ПЖ, а также легкие, почки, селезенка и лейкоциты, органы, в клетках которых ранее была обнаружена активность гена ЦП. Об активности гена ЦП судили по относительному уровню двух сплайс-форм мРНК: мРНК, кодирующей секреторной ЦП (сЦП-мРНК), и мРНК, кодирующей ЦП, заякоренный в мембрану через гликозилфосфатидил инозитол (ГФИ-ЦП мРНК). Данные полуколичественного ОТ-ПЦР анализа показали, что в клетках всех отобранных органов ген ЦП экспрессировался и обе изоформы мРНК формировались. Ни в одном из перечисленных органов, исключая ПЖ, Ag-диета не стимулировала активность гена ЦП. Только в клетках ПЖ наблюдали повышения уровня сЦП-мРНК и ГФИ-ЦП мРНК. Параллельно с увеличением активности гена ЦП в ПЖ повышался уровень экспрессии генов, чьи продукты ответственны за металлирование ЦП. Поэтому подкожный жир был отобран как самый вероятный орган, клетки которого компенсируют дефицит холо-ЦП у Ag-крыс. Из клеток подкожного жира методом дифференциального центрифугирования были получены фракции, обогащенные фрагментами клеточной мембраны и комплекса Гольджи. В обеих фракциях методом иммуноблотинга обнаружено присутствие иммунореактивных полипептидов ЦП, обладающих оксидазной активностью. В экспериментах с использованием метаболического мечения в присутствии [^{14}C]-аминокислот было показано, что срезы подкожного жира синтезируют и секретируют [^{14}C]-ЦП, преципитируемый специфическими антителами. У Ag-крыс удельное содержание [^{14}C]-ЦП примерно в 2 раза выше, чем у контрольных животных.

Результаты и их обсуждение. Данное исследование выявляет новые аспекты роли клеток подкожного жира в поддержании гомеостаза меди. Нами показано, что подкожный жир может быть частью cross-talk системы, контролирующей баланс меди в организме млекопитающих, что может быть использовано для изучения взаимосвязи между ростом опухолей, ожирением и метаболизмом меди. Исследования межорганной регуляции метаболизма меди в ответ на изменение статуса меди может помочь в поиске новых противоопухолевых подходов, основанных на снижении уровня биодоступной меди.

Работа поддержана грантами РФФИ № 16-34-60219 и 14-04-01640.

Литература

1. *Linder M. C.* Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update // Metallomics.— 2016.— [Epub ahead of print, PMID: 27426697].
2. Non-hepatic tumors change the activity of genes encoding copper trafficking proteins in the liver / Babich P. S., Skvortsov A. N., Rusconi P., Tsymbalenko N. V., Mutanen M., Puchkova L. V., Broggini M. // Cancer Biol Ther.— 2013.— Vol. 14, № 7.— P. 614–624.

3. Cardiac copper deficiency activates a systemic signaling mechanism that communicates with the copper acquisition and storage organs / Kim B. E., Turski M. L., Nose Y., Casad M., Rockman H. A., Thiele D. J. // Cell. Metab.— 2010.— Vol. 11.— P. 353–363.

4. The effects of silver ions on copper metabolism in rats / Ilyechova E. Y., Saveliev A. N., Skvortsov A. N., Babich P. S., Zatulovskaia Y. A., Pliss M. G., Korzhevskii D. E., Tsymbalenko N. V., Puchkova L. V. // Metallomics.— 2014.— Vol. 6, № 10.— P. 1970–1987.

МЕТОД ОЦЕНКИ СИЛ АДГЕЗИИ В СИСТЕМЕ «МОДЕЛЬ ПРОКАРИОЦИТА — ЭУКАРИОЦИТ» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ

[1,2]И. В. Конышев, [3]В. Л. Кононенко, [1,2]А. А. Бывалов
[1]Вятский государственный университет, Киров, Россия
[2]Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия
[3]Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

konyshevil@yandex.ru

Введение. Одна из причин высокой смертности от инфекций заключается в недостаточности знаний о тонких патогенетических механизмах того или иного заболевания. Применительно к бактериальным инфекциям остаются малоизученными первые стадии инвазии микробов в макроорганизм, главным образом, адгезия к клеткам-мишеням с последующим проникновением в них. В последние годы, в связи с совершенствованием биофизических методов исследования бактериальной адгезии, для характеристики тонких взаимодействий начинает применяться метод оптической ловушки.

Целью работы являлась разработка способа оценки сил отрыва функционализированных микросфер от эукариоцитов методом оптической ловушки.

Материалы и методы. Полистироловые микросферы диаметром 1 мкм сенсибилизировали препаратом липополисахарида, выделенного из клеток *Yersinia pseudotuberculosis*, выращенных при +10° С, методом водно-фенольной экстракции [1]. Затем часть микросфер, покрытых ЛПС-10 (PS-ЛПС-10), обрабатывали асцитными жидкостями, содержащими антитела МКАт2 к О-боковым цепям ЛПС-10 (PS-ЛПС-10-МКАт2) [2] и МКАт7 к белковому эпитопу наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis* (PS-ЛПС-10-МКАт7) [3]. В качестве контроля использовали микросферы, обработанные бычьим сывороточным альбумином (PS-БСА).

Макрофаги J774 (Коллекция Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) асептически пересевали на чашку «Fluorodish» диаметром 35 мм (WPI, USA) с полной питательной средой RPMI-1640 до конечной концентрации $(10–30)\times10^3$ клеток/мл, инкубировали в CO_2-инкубаторе (5% CO_2) при 37° С в течение 18 ч. Измерения сил отрыва сенсибилизированных микросфер от поверхности макрофагов выполнены на приборе NanoTracker™ JPK Instruments AG в фосфатном буфере.

Вслед за калибровкой прибора выбирали удобную для измерений клетку и осуществляли процедуру подведения клетки к микросфере с расстояния около 4 мкм пьезостоликом с шагом 50 нм до их соприкосновения. Момент соприкосновения клетки с микросферой индицировался первым скачкообразным уменьшением сигнала квадрантного фотодетектора (КФД). После соприкосновения производили ещё два контрольных шага в условиях контакта объектов и останавливали столик. Сразу после остановки столика (на практике — через 0,8–1,0 сек) начинали его отведение в автоматическом режиме со скоростью 0,1 мкм/сек в исходное положение. Если контакт микросферы с поверхностью макрофага приводил к их связыванию, то на хронограмме при отведении столика после линейного нарастания величины сигнала наблюдался резкий скачок, свидетельствующий о разрыве связи.

Амплитуду скачка сигнала пересчитывали в значение силы отрыва на основе калибровок чувствительности (26–28 мВ/нм) и жёсткости лазерного пинцета (0,25–0,28 пН/нм), производимых перед каждой серией измерений. На основании разработанной методики были оценены силы отрыва микросфер каждого типа от поверхности макрофагов (рисунок).

Результаты и их обсуждение. На рис. представлены непрерывные распределения, аппроксимирующие гистограммы сил отрыва микросфер, функционализированных с использованием препарата ЛПС-10. Анализ этих данных показывает, в среднем, относительно высокую силу связи между макрофагами и микросферами «PS-ЛПС-10» и «PS-ЛПС-10-МКАт7». Микросферы «PS-ЛПС-10-МКАт2», характеризовались существенно меньшей силой связи с макрофагами по сравнению с микросферами двух вышеуказанных типов и практически не отличались по оцениваемому свойству от контрольных микросфер, покрытых БСА.

Антитела МКАт2, связываясь с комплементарными эпитопами О-боковых цепей сенситина микросфер — препарата ЛПС, снижают силу оцениваемого взаимодействия. Антитела МКАт7, распознающие антигенную детерминанту наружной мембраны иерсиний белковой природы и поэтому неспособные специфически связываться с микросферами, покрытыми ЛПС, указанный эффект не вызывают.

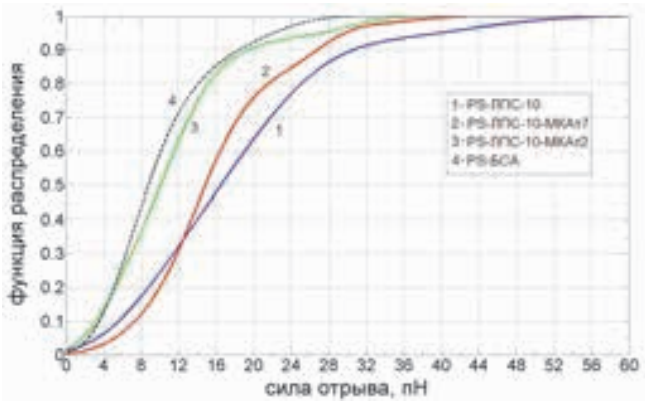


Рисунок. Интегральные распределения измеренных сил отрыва от макрофагов микросфер разных типов.

Выводы. 1. Разработан метод сенсибилизации полистироловых микросфер препаратом ЛПС Yersinia pseudotuberculosis, а также способ регистрации сил отрыва в системе «модель прокариоцита — эукариоцит» с использованием лазерной ловушки.

2. Путём обработки микросфер моноклональными антителами выявлена существенная роль О-боковых цепей ЛПС-10 в адгезивности клеток Yersinia pseudotuberculosis к макрофагам J774.

Литература

1. *Westphal O., Jann K.* Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure // Methods Carbohydr. Chem.— 1965.— Vol. 5.— P. 83–91.
2. *Byvalov A. A., Dudina L. G., Litvinets S. G., Novikova O. D., Khomenko V. A., Portniagina O. Y., Ovodov Y. S.* Study of Yersinia pseudotuberculosis surface antigen epitopes using monoclonal antibodies // Prikl. Biokhim. Mikrobiol.— 2014.— Vol. 50, № 2.— P. 203–210.
3. Immunochemical activity of Yersinia pseudotuberculosis B-antigen / Byvalov A. A., Dudina L. G., Chernyad'ev A. V., Konyshev I. V., Litvinets S. G., Ovodov Y. S. // Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.— 2015.— Vol. 33, № 2.— P. 32–38.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАКТОРА, ИНГИБИРУЮЩЕГО МИГРАЦИЮ МАКРОФАГОВ, С ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ: РОЛЬ ЛАБИЛЬНЫХ ИОНОВ МЕДИ

В. А. Костевич, А. В. Соколов, Н. А. Грудинина, Е. Т. Захарова, В. Б. Васильев
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Hfa-2005@yandex.ru

Введение. Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF) —провоспалительный цитокин, являющийся мишенью фармакологического воздействия при лечении септического шока и рака с помощью специфических антител к MIF. Данный белок с молекулярной массой 12 кДа обладает таутомеразной ферментативной активностью в отношении гидроксифенилпирувата (HPP). Физиологический субстрат таутомеразной активности на данный момент не выявлен, однако известно, что для ее проявления необходим аминокислотный остаток P1 в активном центре MIF, который отвечает также за связывание MIF с клеточным рецептором CD74 и проведение провоспалительного сигнала [1]. Церулоплазмин (CP) — медь-содержащий белок плазмы крови, имеющий в своей структуре шесть прочно связанных ионов меди, а также по меньшей мере три сайта для связывания лабильных ионов Cu(II), два из которых способны связывать ионы Ni(II) и Co(II) [2]. Важнейшей характеристикой CP является его способность окислять ионы Fe^{2+} до Fe^{3+}, однако его физиологическая роль не ограничивается окислением железа. Как белок острой фазы воспаления, CP обладает множеством ферментативных свойств и способностью модулировать активность ряда медиаторов воспаления [3].

Известно, что в моче, полученной от пациентов с инфекциями урогенитального тракта, был обнаружен комплекс MIF с CP [4]. Тем не менее, функциональные характеристики комплекса не были получены.

Целью проведенного исследования было получение и описание комплекса MIF-CP, а также выявление физиологической роли данного взаимодействия.

Материалы и методы исследования. Препарат CP получали из плазмы крови методом хроматографии на UNOSphere Q и неомицин-агарозе. Рекомбинантный MIF человека был получен путем трансформации штамма E. Coli M15[pREP4] с использованием плазмидыptt100. Гель-фильтрация комплекса MIF-CP для определения молекулярной массы комплекса проводилась на колонке с Sephacryl S-200 HR. Исследование взаимодействия MIF с CP методом поверхностного плазмонного резонансапроводилось на инструменте Biacore X100 (GE-Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Таутомеразная активность MIF и способность CP в присутствии ионов Cu(II) ингибировать данный процесс оценивались спектрофотометрически в кинетическом режиме на приборе СФ-2000-02 (ОКБ-спектр, Россия).

Исследование выживаемости животных после введения LPS, CP, $CuSO_4$ и антител к MIF включало 140 серых мышей-самцов, которым вводили внутрибрюшинно 5 мг D-галактозамина и 200 нг липополисахарида (LPS) для моделирования септического шока. Затем животные были разделены на 5 групп по 28 мышей, которым вводили внутрибрюшинно соответственно: (1) контрольная группа, (2) 5 мг CP, (3) 18 мкг $CuSO_4$, (4) 5мг CP+18 мкг $CuSO_4$, (5) 5мг CP+18 мкг $CuSO_4$+5 мг аффинных

антител против MIF. В последующие 4 дня количество выживших животных оценивалось каждые 24 часа. Предыдущие эксперименты показали, что в отсутствие LPS введение комбинации D-галактозамин + CP + $CuSO_4$ не приводило к летальному исходу.

Результаты и их обсуждение. Исследование действия CP в отношении таутомеразной активности MIF показало, что CP проявляет ингибирующую способность только в присутствии ионов Cu (II) и является бесконкурентным ингибитором данной реакции, образуя комплекс CP-Cu(II)-MIF-HPP. Ki составила 37 нМ.

Методом поверхностного плазмонного резонанса было показано формирование комплекса MIF-CP с Kd=4,2 мкМ. Комплекс образовывался только в присутствии ионов Cu(II) и при условии ковалентной модификации активного центра MIF метилфенилсульфонилфторидом (PMSP).

При очистке комплекса методом гель-фильтрации было установлено, что он имеет молекулярную массу около 440 кДа, что соответствует стехиометрии 3MIF:3CP.

Изучение выживаемости животных на модели септического шока продемонстрировало повышение смертности с 54% до 100% в группе мышей, получавших комбинацию CP+$CuSO_4$. Одновременное введение 5 мг аффинных антител против MIF препятствовало летальному эффекту. Отдельное введение CP или $CuSO_4$ не приводило к уровню летальности, отличному от контрольной группы.

Таким образом, было показано образование комплекса MIF-CP, в формировании которого ключевая роль принадлежит ионам Cu(II) в лабильных сайтах CP. Можно предположить, что в условиях воспаления данное взаимодействие повышает сродство MIF к его рецептору CD74 и оказывает провоспалительный эффект.Возможность модулировать таутомеразную активность MIF может быть перспективна для коррекции его участия в воспалительных реакциях.

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-04-01182.

Литература

1. *Denkinger C. M., Metz C., Fingerle-Rowson G.* Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).— 2004.— Vol. 52.— P. 389–400.
2. *Lindley P. F., Card G., Zaitseva I.* An X-ray structural study of human ceruloplasmin in relation to ferroxidase activity // J. Biol. Inorg. Chem.— 1997.— Vol. 2.— P. 454–463.
3. Sokolov A. V., Pulina M. O., Ageeva K. V. Identification of leukocyte cationic proteins that interact with ceruloplasmin // Biochemistry (Mosc).— 2007.— Vol. 72.— P. 872–877.
4. *Meyer-Siegler K. L., Iczkowski K. A., Vera P. L.* Macrophage migration inhibitory factor is increased in the urine of patients with urinary tract infection: macrophage migration inhibitory factor-protein complexes in human urine // J. Urol.— 2006.— Vol. 175.— P. 1523–1528.

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА RS4537545 (C>T) ГЕНА *IL6R* В РАЗВИТИИ НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА

[1]*И. В. Курбатова*, [2]*О. П. Дуданова*, [1]*Л. В. Топчиева*
[1]Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия
[2]Петрозаводский государственный университет, Россия

irina7m@yandex.ru

Введение. Интерлейкин 6 (IL6) играет важную роль в прогрессировании неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), поскольку опосредует развитие стеатоза печени [1]. Известно, что действие IL6 на клетку опосредуется рецептором IL6R. Гепатоциты и гематопоэтические клетки являются главными источниками растворимой формы IL6R, обеспечивающей транс-сигналинг, приводящий к проявлению провоспалительного действия IL6 [2]. В литературе накоплены данные по ассоциации ряда вариантов гена *IL6R* с развитием полигенных заболеваний. Одним из малоизученных полиморфизмов является rs4537545 (C>T) в интроне гена *IL6R*. В литературе практически нет сведений по ассоциации данного полиморфизма с развитием патологий печени.

Цель работы — изучение связи полиморфного маркера rs4537545 (C>T) гена *IL6R* с развитием НАСГ.

Методы исследования. Использовали образцы венозной крови пациентов с установленным впервые диагнозом НАСГ (слабой и умеренной активности) и здоровых доноров. Для генотипирования методом ПЦР-ПДРФ использованы образцы ДНК, выделенной из цельной крови 190 здоровых людей (возраст 45,83±1,06 лет), 174 пациентов с НАСГ (возраст 48,41±0,93 лет). Оценивались печеночные функциональные пробы (таблица) и липидный спектр крови. Содержание тканевого полипептид-специфического антигена (ТПС) (фрагментов цитокератина 18) и цитокинов в крови определяли методом ИФА. Уровень транскриптов генов каспаз в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) оценивали методом ПЦР в режиме реального времени относительно уровня транскриптов гена *GAPDH*. Исследование выполнено на научном оборудовании ЦКП ИБ КарНЦ РАН. Статистическая обработка проведена в программе «StatGraphics 2.1». Достоверность различий частот аллелей и генотипов в группах оценивали с помощью критерия χ^2. Для оценки риска развития НАСГ рассчитывали показатель соотношения шансов (OR) с 95%-м доверительным интервалом. Для оценки различий биохимических показателей использовали непараметрический критерий U Вилкоксона-Манна-Уитни. Использован дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса. Различия достоверны при $p<0,05$.

Таблица

Уровень некоторых показателей крови у носителей разных генотипов по полиморфному маркеру rs4537545 (C>T) гена *IL6R* в контрольной группе и группе пациентов с НАСГ

Исследуемые показатели	Контрольная группа		Группа больных НАСГ	
	Генотипы		Генотипы	
	CC+CT (n=26)	TT (n=10)	CC+CT (n=50)	TT (n=24)
АЛАТ, Ед/л	18,53±1,20 (17,70)	15,80±3,24 (13,10)	56,46±4,44 (45,10)	58,49±7,37 (48,15)
АСАТ, Ед/л	22,54±2,46 (19,00)	18,52±1,72 (18,00)	43,87±2,85 (38,95)	44,31±6,90 (34,40)
Билирубин общий, мкмоль/л	16,19±2,42 (14,20)	18,53±3,72 (11,78)	22,28±1,42 (18,90)	19,59±2,57 (17,35)
Билирубин прямой, мкмоль/л	5,45±1,88 (5,20)	7,73±1,91 (4,91)	7,82±0,94 (6,89)	8,06±1,84 (5,00)
ЩФ, Ед/л	103,40±23,37 (99,35)	119,67±21,12 (111,24)	208,04±14,43 (187,50)	210,42±14,51 (206,00)
Уровень экспрессии каспаз в ЛПК, отн. ед.				
Каспаза 3	0,056±0,010 (0,036)	0,067±0,020 (0,037)	0,023±0,004 (0,014)*(p=0,039)	0,031±0,004 (0,025)
Каспаза 6	0,017±0,003 (0,009)	0,022±0,008 (0,010)	0,010±0,002 (0,006)	0,011±0,003 (0,007)
Каспаза 8	0,024±0,005 (0,012)	0,024±0,007 (0,018)	0,018±0,003 (0,011)	0,018±0,005 (0,007)
Каспаза 9	0,047±0,010 (0,031)	0,027±0,006 (0,026)	0,028±0,005 (0,016)	0,030±0,007 (0,016)
Фибриноген, г/л	3,48±0,34 (3,10)	2,92±0,38 (2,90)	3,23±0,24 (3,25)	2,57±0,24 (2,70)
СРБ, мг/л	0,00±0,00 (0,00)	0,00±0,00 (0,00)	1,31±0,25 (0,00)	3,11±0,87 (0,10)
ТПС, Ед/л	101,37±12,93 (96,52)	109,27±21,31 (98,26)	300,90±37,04 (216,00)	214,39±21,31 (185,01)
IL6, пг/мл	3,69±0,84 (2,26)	1,93±0,44 (2,00)	6,93±1,14 (6,50)	6,47±0,8 (6,25)
IL1β, пг/мл	3,06±0,73 (2,04)* (p=0,008)	5,62±0,94 (5,66)	5,92±1,11 (3,52)	6,50±0,86 (5,76)
TNFα, пг/мл	4,91±0,52 (5,33)	3,83±0,40 (3,83)	6,40±0,53 (6,17)	6,35±0,5 (6,15)
IL10, пг/мл	5,99±0,71 (5,68)* (p=0,003)	11,98±1,09 (9,80)	14,74±1,66 (12,00)	13,60±2,13 (13,60)

Примечание: данные представлены в виде M ± m (медиана). Достоверные отличия (согласно критерию U Вилкоксона-Манна-Уитни): * — по сравнению с носителями генотипа TT в той же группе.

Результаты работы. Распределение частот аллелей по rs4537545 гена *IL6R* в контроле и группе больных НАСГ не различается, в то время как распределение частот генотипов различаются достоверно (χ^2=14,90 (df=2, p<0,05)). Частота генотипа ТТ у пациентов с НАСГ (22%) выше, чем в контроле (14%). У носителей генотипа ТТ достоверно повышен риск развития НАСГ, OR=1,73 (1,01;2,99). У здоровых доноров с генотипом ТТ уровни IL1β и IL10 в крови выше, чем у носителей аллеля С (таблица). Влияние замены rs4537545 гена *IL6R* на содержание IL1β и IL10 в плазме крови здоровых людей достоверно (H=7,11; p=0,008 и H=8,95; p=0,003 соответственно). У больных с генотипом ТТ уровень экспрессии мРНК гена каспазы 3 выше по сравнению с носителями аллеля С (таблица). При этом влияние замены rs4537545 гена *IL6R* на данный показатель не достоверно (H=2,31; p=0,129). Уровни других показателей крови, в том числе липидов (данные не показаны), у носителей разных генотипов не различались (таблица).

Выводы. 1. Впервые установлена ассоциация полиморфного маркера rs4537545 гена *IL6R* с развитием НАСГ. 2. Носительство генотипа ТТ по маркеру rs4537545 гена *IL6R* является предиктором повышения уровня цитокинов IL1β и IL10 в крови доноров контрольной группы. В группе пациентов с НАСГ выявлено повышение уровня транскриптов гена каспазы 3 у носителей генотипа ТТ. Таким образом, наличие мутации (rs4537545) гена *IL6R* может определять генетическую предрасположенность к развитию неалкогольного стеатогепатита.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (Тема № 0221-2014-0008). Работа также поддержана стипендией Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2015–2017 гг.

Литература

1. *Braunersreuther V., Viviani G. L., Mach F., Montecucco F.* Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease // World Journal of Gastroenterology.— 2012.— Vol. 18, № 8.— P. 727–735.
2. *Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S.* The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 // Biochim. Biophys. Acta.— 2011.— Vol. 1813, № 5.— P. 878–888.

ВОЗРАСТНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ КРИСТАЛЛОГЕННЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ДЕТЕЙ

[1-3]А. К. Мартусевич, [1]Л. М. Козлова, [1]З. И. Прудникова, [1]Л. К. Ковалёва
[1]Кировская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ, Россия
[2]Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр Министерства здравоохранения РФ, Нижний Новгород, Россия
[3]Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, Россия

cryst-mart@yandex.ru

Известно, что имеют место выраженные особенности метаболического статуса организма детей в разные возрастные периоды [1]. Это в полной мере отражается и на компонентном составе их биологических жидкостей [1]. Следовательно, логично предположить неодинаковость кристаллогенной активности биосред у детей разного возраста. В то же время практически отсутствуют работы, подтверждающие эту гипотезу. На этом основании **целью работы** служило изучение зависимости характера дегидратационной структуризации слюны и мочи у детей различных возрастных групп.

Материал и методы исследования. В исследование было включено 39 практически здоровых детей, разделенных на 3 группы: от 3 до 7 лет (n=12); от 8 до 12 лет (n=12) и от 13 до 17 лет (n=15), у которых однократно получили образцы слюны и мочи. Сбор биологических жидкостей осуществляли натощак, слюну собирали в чистые сухие пробирки после двухкратного промывания полости рта дистиллированной водой.

Кристаллогенные свойства биосред изучали с помощью метода классической кристаллоскопии [2]. Описание результатов дегидратации микропрепаратов производили морфологически и визуаметрически (с использованием собственной системы полуколичественных критериев) [2].

Полученные данные были обработаны статистически в программном пакете Statistica 6.0. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом характера распределения признака для оценки статистической значимости различий применяли Н-критерий Краскала-Уоллеса.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что по обеим исследованным биологическим жидкостям в сформированных группах имели место существенные различия. Так, при собственной кристаллизации слюны детей дошкольного возраста (3–7 лет) в фациях преобладали структуры аморфного строения, которым сопутствовали единичные одиночно-кристаллические элементы с умеренной степенью деструкции. У детей более старшей возрастной группы (8–12 лет) в микропрепаратах слюны обнаруживали значительное снижение доли аморфных тел, что сопровождалось относительным нарастанием количества кристаллических структур, в том числе дендритных. У лиц старшего школьного возраста (13–17 лет) вновь наблюда-

ли тенденцию к увеличению представительства аморфных элементов, но плотность структур в целом существенно превышала аналогичную в микропрепаратах слюны детей других групп. Это подтверждают результаты критериального (визуаметрического) анализа фаций слюны (рисунок).

Возрастная динамика просматривалась и в фациях мочи детей сформированных групп. Так, во второй группе (8–12 лет) отмечена минимальная плотность кристаллических элементов в сочетании с наиболее высокой их

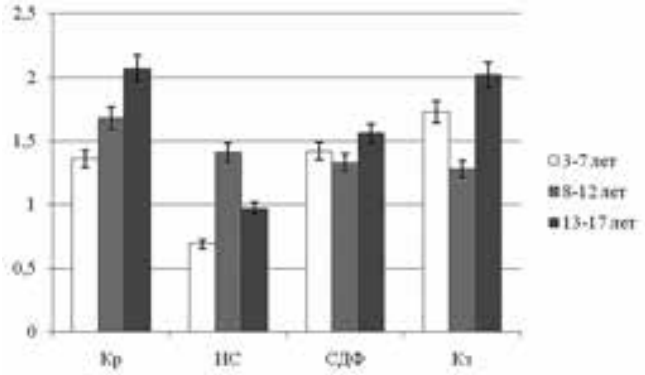


Рисунок. Результаты критериальной оценки кристаллограмм слюны детей различного возраста. Кр — кристаллизуемость, ИС — индекс структурности, СДФ — степень деструкции фации, Кз — выраженность краевой зоны. ВАсе параметры представлены в баллах.

структурированностью (в микропрепаратах преобладали дендритные элементы). Однако в целом плотность кристаллических структур в кристаллограммах мочи детей была умеренной.

Особенностью фаций мочи детей старшего школьного возраста (13–17 лет) явился выраженный полиморфизм структур, а также повышенный уровень их деструкции. Это, на наш взгляд, может быть обусловлено наибольшей гетерогенностью состава данной биосреды у представителей указанной группы. Приведенные морфологические вариации микропрепаратов биологической жидкости полностью подтверждены результатами визуаметрического их описания, на основании которого максимальный уровень индекса структурности зарегистрирован во второй группе, минимальный — у детей третьей группы. Кристаллизуемость и выраженность краевой зоны были зафиксированы на низких значениях у всех детей. Наиболее высокая степень деструкции фации характерна для фаций мочи представителей третьей группы, а наименьшая — у детей второй группы.

Заключение. Таким образом, проведенное исследование подтверждает наличие возрастной вариабельности кристаллогенных свойств слюны и мочи детей. В то же время представляет интерес развитие полученных результатов в плане сопоставления данных кристаллоскопии и компонентного состава биологических жидкостей, в первую очередь —по минеральным компонентам, а также белковому профилю плазмы.

Литература

1. Безруких М. М., Фарбер Д. А. Физиология развития ребенка.— М.: Изд-во МПСИ, 2010.— 768 с.
2. Мартусевич А. К., Камакин Н. Ф. Унифицированный алгоритм исследования свободного и инициированного кристаллогенеза биологических жидкостей // Клиническая лабораторная диагностика.— 2007.— № 6.— С. 21–24.

ХЛОРПРОМАЗИН ВЫЗЫВАЕТ CA^{2+}-ОТВЕТЫ В МАКРОФАГАХ

А. А. Наумова, З. И. Крутецкая, Л. С. Миленина, Н. И. Крутецкая, С. Н. Бутов
Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

anaumova07@gmail.com

Введение. Хлорпромазин (ХП, аминазин, торазин) относится к нейролептикам фенотиазинового ряда, широко используемым для лечения шизофрении [1]. Установлено многогранное влияние ХП на клеточные процессы. Множественность эффектов ХП может быть связана с его амфифильной природой. Будучи положительно заряженным амфифильным соединением, ХП хорошо проникает через мембраны. Показано, что ХП взаимодействует в основном с внутренним монослоем мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды, в первую очередь фосфоинозитиды [2]. Благодаря этому, ХП может модулировать внутриклеточные процессы, такие как передача сигналов и внутриклеточный транспорт. Кроме того, показано, что фенотиазины (ХП, трифлуоперазин) влияют на Ca^{2+}-зависимую активацию макрофагов и оказывают иммуномодулирующий эффект на перитонеальные макрофаги крысы [3].

Цель работы. Представлялось целесообразным исследовать влияние ХП на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+}, $[Ca^{2+}]_i$, в перитонеальных макрофагах крысы.

Материалы и методы. Для измерения $[Ca^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный Ca^{2+}-зонд Fura-2 AM. Для регистрации отношения интенсивностей флуоресценции свободной и связанной с Ca^{2+} форм красителя использовали оригинальную автоматизированную установку на базе люминесцентного микроскопа Leica DM 4000B.

Результаты и обсуждение. В экспериментах исследовано влияние ХП в концентрации 25, 50, 75 и 100 мкг/мл на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах. Показано, что в среде, содержащей ионы Ca^{2+}, ХП вызывает дозозависимое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ (рисунок). При приложении ХП происходит быстрое повышение $[Ca^{2+}]_i$ от базального уровня, равного 92±16 нМ, после чего наблюдается длительная фаза плато Ca^{2+}-ответа. $[Ca^{2+}]_i$ на фазе плато составляет 147±18, 205±19, 253±16 и 269±16 нМ после добавления 25, 50, 75 и 100 мкг/мл ХП,

соответственно. По каждой исследованной концентрации проведено 8 независимых экспериментов.

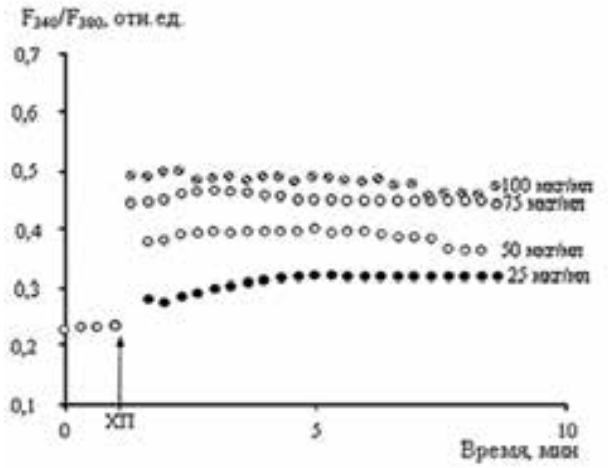


Рисунок. Влияние хлорпромазина (ХП) на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. По оси ординат — отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс — время. К макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, добавляли 25, 50, 75 или 100 мкг/мл ХП. Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант из 8 независимых экспериментов.

Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ после введения ХП может быть связано как с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+}-депо, так и с входом Ca^{2+} из наружной среды. Для выяснения механизма повышения $[Ca^{2+}]_i$ при действии ХП были проведены эксперименты в номинально бескальциевой среде. Так, добавление ХП (50 мкг/мл) к макрофагам в бескальциевой среде также вызывает быстрое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ (до 175±19 нМ) с последующей фазой плато, связанное с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+}-депо. При введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдается дальнейшее повышение $[Ca^{2+}]_i$ (до 217±20 нМ). Это увеличение $[Ca^{2+}]_i$ длится все время присутствия Ca^{2+} в среде и связано со входом Ca^{2+} из наружной среды.

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Так, обнаружено, что ХП вызывает мобилизацию Ca^{2+} из депо в ооцитах Xenopus [4] и перитонеальных макрофагах морской свинки [5].

Механизм, посредством которого ХП вызывает мобилизацию Ca^{2+} из депо, требует дальнейших исследований. Быстрое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ при добавлении ХП позволяет предположить активацию IP3-чувствительных каналов Ca^{2+}-выброса в мембране Ca^{2+}-депо. Кроме того, мобилизация Ca^{2+}, вызванная ХП, имеет стационарную фазу (фазу плато), что может свидетельствовать о том, что предотвращается выведение Ca^{2+} из цитозоля. Можно предположить, что ХП ингибирует Ca^{2+}-АТФазы в мембране Ca2+-депо и Ca^{2+}-АТФазы и Na^{+}-Ca^{2+}-обменники в плазмалемме. Это подтверждается данными литературы о том, что ХП ингибирует Ca^{2+}-АТФазы плазмалеммы и эндоплазматического ретикулума [6].

Выводы. Нами впервые показано, что ХП увеличивает $[Ca^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из Ca^{2+}-депо и последующий вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы.

Литература

1. *Dilsaver S. C.* Antipsychotic agents: a review // Am. Fam. Phys.— 1993.— Vol. 47.— P. 199–204.
2. Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers / Chen J. Y., Brunauer L. S., Chu F. C., Helsel C. M., Gedde M. M., Huestis W. G. // Biochim. Biophys. Acta.— 2003.— Vol. 1616.— P. 95–105.
3. Effect of phenothiazines on protein kinase C- and calcium-dependent activation of peritoneal macrophages / Hadjimitova V., Bakalova R., Traykov T., Ohba H., Ribakov S. // Cell Biol. Toxicol.— 2003.— Vol. 19.— P. 3–12.
4. Quamme G. A. Chlorpromazine activates chloride currents in Xenopus oocytes // Biochim. Biophys. Acta.— 1997.— Vol. 1324.— P. 18–26.
5. *Hirata M., Hashimoto T., Hamashi T., Koga T.* Changes of intracellular free Ca^{2+} in macrophages following N-formyl chemotactic peptide stimulation. Direct measurement by loading of Quin 2 // J. Biochem.— 1984.— Vol. 96.— P. 9–16.
6. *Bhattacharyya D., Sen P. C.* The effect of binding of chlorpromazine and chloroqiune to ion transporting ATPases // Mol. Cell. Biochem.— 1999.— Vol. 198.— P. 179–185.

КОВАЛЕНТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БИОТИНОМ СМЫСЛОВОЙ ЦЕПИ ПЛАЗМИДЫ ДЛЯ ТРАНСФЕКЦИИ *IN VIVO*

[1,2,3]*Д. С. Поляков*, [2]*А. Е. Ходова*
[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия
[3]Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия
ravendoctor@mail.ru

Введение. Актуальность генной терапии обусловлена большим числом моногенных заболеваний, среди которых многие являются инвалидизирующими и социально значимыми. Вирусные способы доставки «правильного» гена хорошо изучены, но небезопасны для использования на многоклеточных организмах. Многие из невирусных способов такой доставки более безопасны, но их эффективность невелика [1]. Во многих проектах частицы, поз-

воляющие, так или иначе, прикрепить плазмиды к носителю, слишком велики. Предложенные ранее варианты решения этой проблемы не были удачными. Нековалентно модифицированные векторы получаются слишком большими, а химические модификации затрагивают целевые гены. Научная новизна нашего проекта заключается в избирательной ковалентной модификации только одной цепи полноразмерной плазмиды.

Цель исследования. Ковалентная модификация плазмиды, несущей терапевтический ген, таким образом, чтобы данная модификация существенно не влияла на экспрессию целевого гена.

Материалы и методы. В работе применяли набор стандартных генноинженерных подходов. Использовали модифицированные плазмиды на основе коммерческого вектора (pEGFP-N3; Novagen, США), содержащего ген зелёного флуоресцентного белка (EGFP), а также на основе созданных нами ранее векторов, содержащих гены белков слияния EGFP с бета-2-микроглобулином [2–4] и транстиретином [5]. Способность полученных плазмид к экспрессии целевого белка была проверена на культуре клеток HEK293.

Результаты и их обсуждение. Создано два типа плазмид, содержащих ген EGFP под эукариотическим промотором. В первом типе плазмид на смысловой цепи дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) часть тимина заменена на урацил, ковалентно связанный с биотином. Во второй плазмиде аналогично модифицирована антисмысловая цепь ДНК. То, что обе плазмиды биотинилированы по всей длине, подтверждает анализ рестриктированных участков биотинилированных плазмид при помощи иммуноблотинга. Для детекции использовали стрептавидин, меченный пероксидазой.

Способность полученных плазмид к синтезу EGFP была оценена на культуре человеческих клеток при помощи флуоресцентной микроскопии. Клетки HEK293 трансфицировались исходными и модифицированными плазмидами по стандартной методике в 96-луночном планшете. Трансфекция внутри каждого опыта осуществлялась в трёх повторностях в разных лунках. Наличие EGFP оценивалось на второй и пятый дни после трансфекции. Для полуколичественного и качественного анализа экспрессии целевых генов использовали лазерный микроскоп. Для возбуждения флуоресценции EGFP использовали лазер с длиной волны 488 нм, для детекции флуоресценции использовали фильтры 505–550 нм. Закономерно, что в случае нарушения или существенного снижения по какой-то причине экспрессии целевого гена должно уменьшаться число и/или интенсивность зелёного свечения клеток. Если флуоресцентная микроскопия клеток, трансфицированных pEGFP-N3, не выявляла существенных отличий от клеток, трансфицированных биотинилированной плазмидой, мы делали вывод о том, что такая модификация не нарушает экспрессии гена EGFP и, как следствие, не влияет на количество продукта данного гена.

Таким образом, получены модифицированные плазмиды с ковалентно присоединённым вдоль всей смысловой цепи биотином. В этом случае почти в полном объеме сохранена способность целевого гена к экспрессии. Получены модифицированные плазмиды с биотином, ковалентно присоединённым вдоль всей матричной цепи. В этом случае нарушена способность целевого гена к экспрессии.

Заключение. Плазмида с биотином, присоединённым вдоль смысловой цепи, может прочно связываться при помощи биотин-стрептавидинового взаимодействия с белками ядерной локализации. Продемонстрированная нами способность плазмид с ковалентно присоединённым биотином к экспрессии целевых генов может позволить в дальнейшем использовать модифицированные таким образом плазмиды для решения широкого круга задач генной терапии.

Литература

1. *Lindberg S., Copolovici D. M., Langel Ü.* Therapeutic delivery opportunities, obstacles and applications for cell-penetrating peptides // Ther. Deliv.— 2011.— Vol. 2, № 1.— P. 71–82.
2. Бета-2-микроглобулиновый амилоидоз: фибриллогенез природного и рекомбинантных бета-2-микроглобулинов человека / Поляков Д. С., Грудинина Н. А., Соловьёв К. В., Егоров В. В., Сироткин А. К., Алейникова Т. Д., Тотолян Арег А., Шавловский М. М. // Мед. акад. журнал.— 2010.— Т. 10, № 2.— С. 40–49.
3. Genetic structures and conditions of their expression, which allow receiving native recombinant proteins with high output / Solovyov K. V., Kern A. M., Grudinina N. A., Aleynikova T. D., Polyakov D. S., Morozova I. V., Shavlovsky M. M. // Int. J. Biomed.— 2012.— Vol. 2, Iss. 1.— P. 45–49.
4. Expression in E. coli and purification of the fibrillogenic fusion proteins TTR-sfGFP and 2M-sfGFP / Solovyov K. V., Polyakov D. S., Grudinina N. A., Egorov V. V., Morozova I. V., Aleynikova T. D., Shavlovsky M. M. // Prep. Biochem. Biotech.— 2011.— Vol. 41, № 4.— P. 337–349.
5. *Polyakov D. S., Sakhabeyev R. G., Shavlovsky M. M.* Partial denaturation of recombinant protein for affinity purification // Appl. Biochem. Microbiol.— 2016.— Vol. 52, № 1.— P. 105–109.

АКТИВНОСТЬ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ *GBA*

[1,2]*К. А. Сенкевич*, [1,3]*А. К. Емельянов*, [1,3]*М. А. Николаев*, [3]*А. Э. Копытова*, [1]*И. Д. Семикова*, [1]*М. В. Белецкая*, [4]*Г. В. Байдакова*, [1,2]*И. В. Милюхина*, [1]*А. А. Тимофеева*, [1]*А. Ф. Якимовский*, [4]*Е. Ю. Захарова*, [1,2,3]*С. Н. Пчелина*

[1]Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Россия
[2]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[3]Петербургский институт ядерной физики им. Б.П Константинова, Гатчина, Россия
[4]Медико-генетический научный центр, Москва, Россия

senkkon@gmail.com

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) второе по распространенности нейродегенеративное заболевание. Мутации в гене глюкоцереброзидазы (GBA), являются значимым и частым генетическим фактором риска развития БП. Риск развития БП у гетерозиготных носителей повышается в 6–7 раз во всех популяциях [1, 2]. Гомозиготное носительство мутаций в гене *GBA* приводит к развитию болезни Гоше (БГ). БГ — это лизосомальная болезнь накопления. Мутации в гене *GBA* приводят к снижению активности глюкоцереброзидазы в разной степени, в зависимости от типа мутации [3]. В последних исследованиях была подтверждена генетическая, нейропатологическая и клиническая ассоциация между болезнью Гоше и БП [4], однако молекулярный механизм высокого риска развития БП у носителей мутаций в гене *GBA*, остается неясным. Мы предположили, что гетерозиготное носительство мутаций может также приводить к снижению активности фермента и лизосомной дисфункции, что в свою очередь способствует накоплению нейротоксичных белков.

Цель исследования: оценить активность глюкоцереброзидазы у пациентов с БП, с GBA-ассоциированной БП и в контроле.

Материалы и методы. Участники исследования. Пациенты с диагнозом БП, установленным в одной из трех клиник: Клинике Института экспериментальной медицины, Первом Санкт-Петербургском медицинском университете им. И. П. Павлова и Научном центре неврологии г. Москва. В контрольную группу были включены пациенты, подходящие по возрасту и полу. Все участники подписали информационное согласие.

Измерение ферментативной активности глюкоцереброзидазы. Активность глюкоцереброзидазы была измерена в сухом пятне крови (DBS- dry blood spot) используя LC-MS/MS. Фильтровальная бумага (Whatman 903 Sample Collection Cards) была высушена в течении 2 часов при комнатной температуре и хранилась при температуре +4° С до измерения активности.

Статистический анализ. Для оценки разницы между группами был применен тест Манна-Уитни. Уровень значимости установлен на $p<0,05$. Статистический анализ был проведен с использованием SPSS 12.0.

Результаты. Скрининг мутаций был проведен у 450 пациентов с БП. В исследование по оценке активности глюкоцереброзидазы были включены: 21 пациент с мутацией в гене *GBA*, (группа GBA-БП), 84 пациента без мутаций в гене *GBA* со спорадической БП (сБП) и 62 пациента контрольной группы с отсутствием неврологических заболеваний. Группа GBA-ассоциированной БП состояла из 12 носителей мутаций GBA (L444P и N370S) и 12 носителей полиморфных вариантов GBA (E326K — 10 носителей, T369M — 1 носитель и 1 пациент с двумя полиморфными вариантами (E326K и T369M)).

Активность глюкоцереброзидазы была измерена у 21 пациента с GBA-ассоциированной БП (средний возраст (60,29±2,32 лет, 13 мужчин), у 84 пациентов с сБП (62,84±0,96 лет, 32 мужчины) и 62 пациентов контроля (62,03±1,32 лет, 32 мужчины). Данные измерения активности глюкоцереброзидазы представлены в таблице. Было выявлено значимое снижение ферментативной активности у группы GBA-ассоциированной БП по сравнению с контролем ($p=0,001$) и по сравнению со сБП ($p<0,0001$). Наиболее выраженное снижение показано у носителей мутаций (L444P, N370S) по сравнению с контролем ($p=0,001$) и сБП ($p<0,0001$). Статистически достоверной разницы между активностью у сБП и контроля выявлено не было.

Таблица

Активность фермента глюкоцереброзидазы

Группы	Ферментативная активность (μмол/л/ч), медиана (мин-макс), p*		
	GBA-БП (N=21)	сБП (N=84)	Контроль (N=62)
Активность глюкоцереброзидазы	5,41 (1,76–15,78), p=0,001	9,33 (3,91–21,83), p=0,062	8,25 (3,00–19,76)

* По сравнению с контролем

Результаты. В данном исследовании мы показали, что у гетерозиготных носителей мутаций в гене GBA с БП снижена активность глюкоцереброзидазы по сравнению со сБП без мутаций в гене GBA и контролем.

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-04-00764 А

Литература

1. Glucocerebrosidase gene mutations are associated with Parkinson's disease in Russia / Emelyanov A., Boukina T., Yakimovskii A., Usenko T., Drosdova A., Zakharchuk A., Andoskin P., Dubina

M., Schwarzman A., Pchelina S. // Movement Disorders.— 2012.— Vol. 27, № 1.— P. 158–159.
2. French Parkinson Disease Genetic Group. Penetrance of Parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers / Anheim M., Elbaz A., Lesage S., Durr A., Condroyer C., Viallet F., Pollak P., Bonaïti B., Bonaïti-Pellié C., Brice A. // Neurology.— 2012.— Vol. 78, № 6.— P. 417–420.
3. Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset / Gan-Or Z., Giladi N., Rozovski U., Shifrin C., Gurevich T., Bar-Shira A., Orr-Urtreger A. // Neurology.— 2008.— Vol. 70.— P. 2277–2283.
4. *Lopez G., Sidransky E.* Predicting parkinsonism: new opportunities from Gaucher disease // Mol Genet Metab.— 2013.— Vol. 109, № 3.— P. 235–236.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ДЛЯ РЕГУЛЯТОРНОГО РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА, ПОДАВЛЯЮЩЕГО АУТОИММУННЫЕ РЕАКЦИИ, НА FC ФРАГМЕНТАХ IGG ЧЕЛОВЕКА

А. Ю. Сидоров, М. П. Ирина, Е. Н. Клюева, А. С. Терентьев, И. В. Меньшиков
Удмуртский государственный университет, УР, Ижевск, Россия

aneck4@rambler.ru

Недавно нами был выявлен новый фактор регуляции аутореактивности, продукция которого препятствует развитию экспериментально вызванных аутоиммунных заболеваний и ассоциирована с их ремиссией [1]. Изучение специфичности данного фактора иммунорегуляции показало, что он представляет собой антиидиотипические антитела к антиген-распознающим рецепторам лимфоцитов против антигенов-индукторов аутоиммунных заболеваний и, в то же время, обладает специфичностью к Fc фрагментам гомологичного IgG [1]. Способность взаимодействовать с Fc фрагментами IgG позволила отнести исследуемые антитела к антителам подобным ревматоидному фактору. Чтобы отличать от классического ревматоидного фактора и обозначить иммунорегуляторные свойства данных антител, они были названы «регуляторный ревматоидный фактор» (регРФ). Было также показано, что антигенные детерминанты для регуляторного ревматоидного фактора крысы можно индуцировать на Fc фрагментах IgG крысы. Иммунизация крыс с коллаген-индуцированным артритом Fc фрагментами редуцирует симптомы артрита и подавляет продукцию аутоантител к коллагену [2]. Полученные факты обозначают лимфоциты, продуцирующие регРФ, как терапевтическую биомишень для подавления аутоиммунных реакций, а Fc фрагменты IgG, несущие антигенные детерминанты для регРФ, как основу вакцины для лечения аутоиммунных заболеваний. Однако не известно, можно ли индуцировать антигенные детерминанты для регРФ на молекуле IgG человека или ее фрагментах. Целью работы было выяснить наличие и локализацию антигенных детерминант для регРФ на фрагментах IgG человека.

В результате папаинового протеолиза было получено 2 вида Fab и один вид Fc фрагментов IgG человека (рис. *а*). FabI фрагменты не обладают сродством к protein G-сефарозе, Fab II фрагменты имеют сродство к protein G-сефарозе, но не взаимодействуют с protein A-сефарозой.

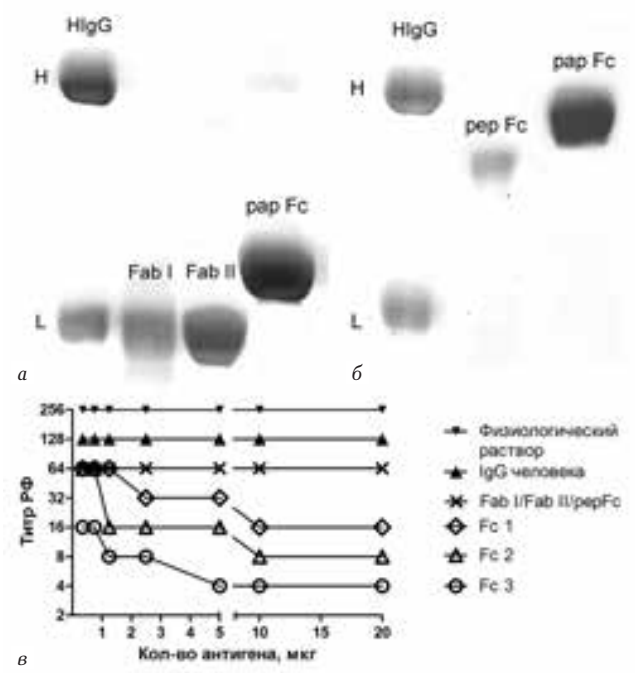


Рисунок. *а* — Электрофореграмма фрагментов IgG человека, полученных методом папаинового протеолиза, в 10% ПААГ в восстанавливающих условиях; *б* —. Электрофореграмма фрагментов IgG человека в 10% ПААГ; *в* — Торможение реакции агглютинации танизированных нагруженных IgG человека эритроцитов, вызванной регРФ человека. HIgG — IgG человека; H — тяжелые цепи IgG человека; L — легкие цепи IgG человека; Fc 1,2,3 — различные партии папаиновых Fc фрагментов IgG человека; papFc — папаиновые Fc фрагменты IgG человека; pepFc — пепсиновые Fc фрагменты IgG человека.

Все образцы Fc фрагментов IgG человека, полученные методом папаинового протеолиза, дозозависимо конкурируют с нагруженными IgG человека танизированными эритроцитами за связывание с регРФ, тогда как нативный IgG не подавляет связывание регРФ (рис. *в*). Присутствие 0,3 мкг Fc фрагментов достаточно для подавления реакции агглютинации, вызванной регулятор-

ным ревматоидным фактором. FabI и FabII фрагменты IgG человека не подавляют связывание регРФ человека (рис. *в*). Следовательно, антигенные детерминанты для регРФ локализованы на Fc фрагментах IgG человека, полученных папаиновым протеолизом.

Чтобы выяснить локализованы антигенные детерминанты для регРФ в области константных доменов или в шарнирной области папаиновых фрагментов, были получены пепсиновые Fc фрагменты IgG человека (рис. *б*). Электрофоретическая подвижность полученных пепсиновых Fc фрагментов в градиентном геле выше, чем папаиновых Fc фрагментов и идентична подвижности папаиновых FabI и FabII фрагментов. Данный факт свидетельствует о том, что пепсиновые Fc фрагменты содержат CH2 домены и отличаются от папаиновых только отсутствием шарнирной области. Пепсиновые Fc фрагменты IgG человека не конкурируют с нагруженными IgG человека танизированными эритроцитами за связывание с регРФ (рис. *в*). Следовательно, антигенные детерминанты для регРФ локализованы в шарнирной области папаиновых Fc фрагментов IgG человека.

Таким образом, антигенные детерминанты для регуляторного ревматоидного фактора, подавляющего аутоиммунные реакции, локализованы в шарнирной области Fc фрагментов IgG человека, и могут быть получены методом папаинового протеолиза IgG.

Литература

1. *Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E., et al.* Rheumatoid factor in idiotypic regulation of autoimmunity // Int J Rheum Dis.— 2015.— Vol. 18.— P. 408–420.
2. *Beduleva L., Menshikov I.* Role of idiotype–anti-idiotype interactions in the induction of collagen-induced arthritis in rats // Immunobiology.— 2010.— P. 963–970.

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ГЕНА CCN2 НА МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ РАКЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д. В. Тюлькина
Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия
tyulkina.dina@mail.ru

Опухоль — это сложное образование, которое представляет собой совокупность раковых и окружающих их стромальных клеток. Строма (микроокружение опухоли) играет важнейшую роль в пролиферации, поддержании и распространении опухолевых клеток. К опухолям с большим содержанием клеток микроокружения относится протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (ПАПЖ), характеризующаяся высоким потенциалом к метастазированию. По литературным данным и данным, полученным ранее в нашей лаборатории, одним из факторов, имеющим высокий уровень продукции в опухолевом микроокружении ПАПЖ, является фактор роста соединительной ткани CCN2. CCN2 — член семейства белков CCN, участвующий во многих аспектах жизнедеятельности клетки. Интересно, что в различных опухолях действие белка CCN2 может обладать противоположным эффектом: при опухолях легкого и яичников CCN2 имеет онкосупрессорную функцию, а при раке груди, толстой кишки и меланомы CCN2 усиливает ангиогенез и метастазирование. Поэтому целью нашей работы было создание конструкций и проведение с ними предварительных экспериментов, которые бы позволили определить, связан ли CCN2 с миграцией клеток при раке поджелудочной железы.

Была амплифицирована кодирующая последовательность гена CCN2 и подтверждена методом секвенирования. Далее были созданы следующие генно-инженерные конструкции на основе плазмиды pGL3-BV: pGL3-CMV-CCN2, pGL3-CMV-CCN2-P2A-CopGFP, pGL3-CMV-CopGFP. Эти конструкции содержат последовательность гена CCN2 и/или последовательность гена аналога зеленого флуоресцентного белка CopGFP под контролем сильного конститутивного промотора цитомегаловируса (CMV). В конструкции pGL3-CMV-CCN2-P2A-CopGFP для одновременной экспрессии двух генов использовался саморасщепляющийся 2A-пептид. Далее этими конструкциями проводили транзиентную трансфекцию клеточной линии рака поджелудочной железы MIA PaCa-2, характеризующейся отсутствием экспрессии гена CCN2. Далее проводился анализ миграционной активности клеток методом зарастания царапины.

Через 24 часа наблюдалось зарастание царапин, сделанных в монослое клеток MIA PaCa-2, которые были трансфицированы плазмидами pGL3-CMV-CCN2 и pGL3-CMV-CCN2-P2A-CopGFP, в то время как в клетках MIA PaCa-2, трансфицированных контрольной плазмидой pGL3-CMV-CopGFP, такого эффекта не было (рисунок). Продукция белка CCN2 в трансфицированных клетках линии MIA PaCa-2 была подтверждена путем детекции белка CopGFP при одновременной экспрессии двух генов в конструкции pGL3-CMV-CCN2-P2A-CopGFP.

Таким образом, мы показали, что созданные конструкции экспрессируют целевые гены, и ген CCN2 предположительно может влиять на миграцию клеток рака поджелудочной железы. Данные конструкции могут быть

Рисунок. Клетки линии MIA PaCa-2 через 24 часа после проведения царапины. Видна усиленная миграция клеток линии MIA PaCa-2, трансфицированных конструкциями, содержащими ген CCN2 (*б*, *в*), по сравнению с контрольными клетками, трансфицированными плазмидой pGL3-CMV-CopGFP. Указаны клетки MIA PaCa-2, трансфицированные конструкцией: *а* — pGL3-CMV-CopGFP; *б* — pGL3-CMV-CCN2; *в* — pGL3-CMV-CCN2-P2A-CopGFP. Увеличение ×100.

использованы в дальнейшей работе по определению возможного влияния фактора CCN2, экспрессируемого клетками опухолевого микроокружения, на раковые клетки при ПАПЖ.

ВЛИЯНИЕ (22R,23R)-22,23-ДИГИДРОКСИ-5А-ХОЛЕСТ-2-ЕН-6-ОНА НА ER/ЦИКЛИН D1 МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПУТЬ В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ MCF-7

[1,2]Т. И. Янова, [4]Ю. В. Ермолович, [2]А. Р. Мехтиев, [2]О. С. Тимошенко, [2,5]И. В. Федюшкина, [3]О. Е. Андреева, [3]А. М. Щербаков, [2]А. В. Веселовский, [4]В. Н. Жабинский

[1]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия
[2]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва, Россия
[3]Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[4]Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
[5]Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

marif@yandex.ru

Наши исследования показали, что новые синтетические брассиностероиды подавляют эстрадиол-индуцированную активацию эстрогенного рецептора альфа (ERa) и блокируют циклин D1-зависимый регуляторный путь в клетках рака молочной железы MCF-7.

Брассиностероиды — гормоны роста растений, регулируют пролиферацию растительных клеток и являются лигандами брассинолидного рецептора. Аналогов подобного рецептора в человеческом организме пока не обнаружено, однако, функциональное сходство можно рассматривать для рецепторов, регулирующих пролиферацию опухолевых клеток. Традиционным объектом исследования являются гормончувствительные клетки карциномы молочной железы MCF-7, в которых эстрогенный рецептор является регулятором пролиферации, а его природные лиганды также имеют стероидную природу.

В наших предыдущих исследованиях [1, 2] природные брассиностероиды проявляли низкие цитостатические эффекты. В данной работе исследованы 22,23-замещенные синтетические соединения, которые являются биосинтетическими предшественниками брассиностероидов и не обладают высокой специфичностью, что позволяет использовать их в качестве регуляторов роста клеток человека.

В экспериментах на культуре клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 была исследована серия синтетических аналогов из 6 соединений, содержащих 22R,23R-диольную группировку в боковой цепи и неполярные группировки в цикле А.

Наиболее активным в клетках MCF-7 оказалось соединение (22R,23R)-22,23-дигидрокси-5а-холест-2-ен-6-он (BR1), IC_{50} которого составила около 8 мкМ при 72 ч инкубации. Подобное время инкубации было выбрано не случайно, поскольку, визуально, наблюдались признаки проявления цитотоксичности после 48 ч инкубации. Предположив, что исследуемое соединение может обладать проапоптотическими свойствами, мы выбрали длительные сроки инкубации. На коротких сроках инкубации эффект не был обнаружен: также, как и в клетках MDA-MB-231 наблюдалась слабая цитотоксичность по результатам МТТ-теста. Исследуемое соединение вызывало 30% апоптоз в клетках MCF-7 при длительных сроках инкубации (72–96 ч) и блокировало рост клеток в фазе деления G0-G1.

Коллективом авторов было принято решение исследовать в дальнейшем одно вещество BR1, поскольку оно оказалось наиболее активным. Основываясь на литературных данных, мы предположили, что «мишенью» для этого соединения может являться эстрогенный рецептор. С целью поиска потенциальной мишени было проведено молекулярное моделирование. Докинг соединения в участок связывания природного лиганда ядерного рецептора

эстрогенов (потенциальной мишени) показал возможность связывания этих соединений с лиганд-связывающим доменом рецептора в антагонистической конформации. Экспериментальные данные показали, что вещество блокирует активацию эстрогенного рецептора и конкурирует в сайте связывания с природным лигандом эстрадиолом. Используя репортерную систему с люциферазой под контролем эстроген-респонсивных элементов (ERE-LUC) для изучения влияния брассиностероида на эстрогенный рецептор, мы обнаружили, что при концентрациях 2,5 мкМ и выше BR1 подавляет его базальную транскрипционную активность. Кроме того, соединение тормозит эстрадиол-индуцированную активность ERa. Краткосрочная (6 ч) обработка клеток MCF-7 10 мкМ брассиностероида вызвала 2,4-кратное подавление активности рецептора. Мы оценили влияние вещества на экспрессию циклина D1, который является важным регулятором клеточного цикла в клетках рака молочной железы. Гибридизация образцов с антителами к циклину D1 показала сильное снижение уровня этого белка после 8 ч обработки брассиностероидом. Таким образом, соединение BR1 подавляет как мРНК, так и уровень белка циклина D1 в клетках рака молочной железы MCF-7.

Из литературы известно, что циклин D1 играет важную роль в регуляции роста эстроген-чувствительных тканей путем потенцирования транскрипции ERa-регулируемых генов [3], и опосредует эту активацию независимо от образования комплекса с циклин-зависимой киназой (CDK). Эти данные подчеркивают новую роль циклина D1 в качестве CDK-независимого активатора эстрогенного рецептора [4]. Таким образом, очень важен поиск новых активных соединений, таргетных к ERa и циклину D1. (22R,23R)-22,23-дигидрокси-5а-холест-2-ен-6-он может являться одним из перспективных соединений, потенциальных агентов для лечения рака молочной железы.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 15-04-99711, в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы.

Литература

1. Синтез секастерина и 24-эписекастерина и их токсичность в клетках MCF-7 / Хрипач В. А., Жабинский В. Н., Гулякевич О. В., Константинова О. В., Мишарин А. Ю., Мехтиев А. Р., Тимофеев В. П., Ткачев Я. В. // Биоорганическая химия.— 2010.— Т. 36, № 6.— С. 815–824.
2. Synthesis and biological activity of probable 24-norbrassinolide biosynthetic precursors / Khripach V. A., Zhabinskii V. N., Ermolovich Iu. V., Guliakevich O. V., Mekhtiev A. R., Karalkin P. A. // Bioorg. Khim.— 2012.— Vol. 38 (4).— P. 499–508.
3. C-Myc or cyclin D1 mimics estrogen effects on cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle reentry / Prall O. W., Rogan E. M., Musgrove E. A., Watts C. K., Sutherland R. L. // Mol. Cell Biol.— 1998.— Vol. 18.— P. 4499–4508.
4. Cell cycle regulators cyclin D1 and CDK4/6 have estrogen receptor-dependent divergent functions in breast cancer migration and stem cell-like activity / Lamb R., Lehn S., Rogerson L., Clarke R. B., Landberg G. // Cell Cycle.— 2013.— Vol. 12.— P. 2384–2394.

Наши подписные индексы:
Агентство «Роспечать» — **57999**
Объединенный каталог «Пресса России» — **42190**

ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ МОРФОГЕНЕЗА В НОРМЕ, ПРИ ПАТОЛОГИИ И В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМАФФИННЫХ КЛЕТОК ОКОЛОСЕРДЕЧНОЙ ОБЛАСТИ НОВОРОЖДЕННОЙ КРЫСЫ

[1]*А. Л. Алексеенко*, [1,2]*Е. И. Чумасов*
[1]Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, Россия
[2]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

iemmorphol@yandex.ru

Введение. Хромаффинные клетки (ХК) были открыты в начале XX столетия и получили свое название из-за способности окрашиваться солями хромовой кислоты в желто-коричневый цвет. На основании их общего происхождения с симпатическими нервными клетками из ганглиозной пластинки [1, 2], а также сходства синтезируемых теми и другими катехоламинов (норадреналин, дофамин, адреналин), их относят к симпато-адреналовой системе. Предполагается, что ХК выполняют как минимум две функции: нейроэндокринную и сенсорную. ХК входят в состав мозгового вещества надпочечников, параганглиев и каротидного тельца. Они были обнаружены в виде небольших долек и тяжей в аортально-пульмональной области (АПО) сердца различных животных (кошка, собака, кролик) и человека и изучены с помощью общегистологических и гистохимических методик, а также электронной микроскопии [1, 3]. В настоящее время для исследования ХК используются маркеры хромогранин А и В, белок PGP 9.5 и другие, выявляемые методом иммуногистохимии (ИГХ) [4, 5]. Однако морфологические особенности ХК в онтогенезе остаются малоизученными.

Цель: изучить локализацию и структуру ХК в АПО новорожденной крысы с использованием комплекса ИГХ-маркеров.

Объекты, материалы и методы. Работа выполнена на новорожденных крысах Вистар (n=5) в соответствии с Приказом Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». У животных 1–2-го дня постнатального периода (Р1–2) выделяли сердце с околосердечной областью и фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [6]. Гистологический анализ проводили на парафиновых срезах толщиной 5–7 мкм. Часть препаратов окрашивали толуидиновым синим. Для ИГХ-исследования применяли кроличьи поликлональные антитела к белку PGP 9.5 (protein gene product 9.5; Spring Bioscince, США; 1:200), к синаптофизину (Syp; Monosan, Нидерланды) и к тирозингидроксилазе (ТГ; Abcam, Великобритания; 1:1000). В качестве вторичных антител применяли реактивы из набора Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/DAB (BioGenex, США).

Результаты и их обсуждение. На препаратах, окрашенных толуидиновым синим, были видны ушки сердца, предсердия и желудочки, в околосердечной области определялись фрагменты главных магистральных сосудов сердца (аорта, легочный ствол, верхняя и нижняя полые вены), трахеи, лимфатического узла, пищевода, нервных стволов и микроганглиев. Поскольку на данном сроке развития выявить ХК с помощью обычной гистологической окраски затруднительно, были использованы нейро-ИГХ-маркеры. Syp — интегральный белок синаптических везикул, который содержится также в эндокринных клетках и является их маркером [4, 6]. У новорожденных крыс в области аорты и легочного ствола были обнаружены Syp-иммунопозитивные (Syp^+) ХК, которые располагались в виде скоплений, одиночно или в составе групп из 2–3 клеток. Syp^+-ХК представляли собой мелкие, окрашенные в темно-коричневый цвет клетки округлой, вытянутой или треугольной формы. Вблизи скоплений ХК встречались отдельные группы молодых нейронов и нейробластов. Иногда ХК в виде цепочек из 5–6 клеток, располагались непосредственно внутри нервных стволиков и пучков. ТГ — ферментный маркер, с помощью которого избирательно выявляются катехоламины. Он позволил выявить не только пучки симпатических волокон, их терминальные аксоны, подрастающие к сосудам, но и ТГ-иммунопозитивные ($ТГ^+$) ХК [5]. Эти клетки были выявлены в тех же местах,— вблизи и внутри крупных нервов и рядом с микроганглиями. $ТГ^+$-ХК имели треугольную или неправильную форму и относительно длинные цитоплазматические отростки, заполненные гранулами. С помощью ИГХ-реакции на PGP 9.5 в АПО сердца новорожденных (Р1–2) крыс PGP-9.5-иммунопозитивные ХК хорошо выявлялись, и локализовались также в нервных стволиках и вблизи ганглиев.

Заключение. Использованный комплекс ИГХ-маркеров позволил выявить у новорожденных крысят ХК сердечной области. Установлено, что ХК, найденные в АПО сердца новорожденных животных, теснейшим образом связаны с нервами и интрамуральными ганглиями. Вопрос о функциях ХК требует дальнейших исследований.

Литература

1. *Ноздрачев А. Д., Чумасов Е. И.* Периферическая нервная система.— СПб.: Наука, 1999.— 281 с.
2. *Huber K.* The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives // Dev. Biol.— 2006.— Vol. 298, № 2.— P. 335–343.
3. *Tanaka K., Chiba T.* Microvascular organization of sympathetic ganglia, with special reference to small intensely-fluorescent cells // Microsc. Res. Tech.— 1996.— Vol. 35, № 2.— P. 137–145.

4. *Чумасов Е. И., Петрова Е. С., Коржевский Д. Э.* Иммуноморфологический анализ иннервации хромаффинных клеток параганглиев артерий и сердца млекопитающих // Журн. эволюц. биохимии и физиологии.— 2011.— Т. 47, № 4.— С. 325–331.
5. *Takaki F., Nakamuta N., Kusakabe T., Yamamoto Y.* Sympathetic and sensory innervation of small intensely fluorescent (SIF) cells in rat superior cervicalganglion // Cell Tissue Res.— 2015.— Vol. 359, № 2.— P. 441–451.
6. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: Руководство / Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Петрова Е. С., Карпенко М. Н., Григорьев И. П., Сухорукова Е. Г., Колос Е. А., Гиляров А. В.— СПб.: СпецЛит, 2014.— С. 119.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕЧЕНИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВОДОРАСТВОРИМОГО СОЕДИНЕНИЯ КРЕМНИЯ

Е. А. Григорьева
Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, Чебоксары, Чувашская Республика, Россия
zhenya_01.09@mail.ru

Введение. Актуальность проблемы длительного поступления кремния в организм связана с тем, что в настоящее время недостаточно изучено длительное влияние соединений кремния на организм в концентрациях, не превышающих, согласно нормативам, предельно допустимую. Исследования профессора В. Л. Сусликова и его учеников позволили создать прочную методологическую базу для экспериментального моделирования поступления с питьевой водой различных соединений [1]. Дальнейшие исследования Сапожникова С. П. установили роль водорастворимого соединения кремния, присутствующего в водно-пищевых рационах жителей «кремниевых» биогеохимических провинций, в развитии хронических заболеваний, в частности, сахарного диабета [2]. Показано, что в эксперименте длительное поступление кремния с питьевой водой приводило к значительным морфологическим изменениям иммунных органов: тимуса, селезенки, пейеровых бляшек [3]. Печень, как известно, также является органом иммунной системы. Поэтому нам стало интересно, как отразится на печени длительное употребление воды с добавлением водорастворимого соединения кремния.

Цель работы: изучить микроморфологические изменения печени при поступлении водорастворимого соединения кремния в течение 9 мес с питьевой водой.

Объекты, материалы и методы. Эксперимент проводился на лабораторных нелинейных самцах крыс, содержавшихся в обычных условиях вивария при естественном освещении. Подопытная группа (5 крыс) получала питьевую воду, соответствующую требованиям ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02 с добавлением метасиликата натрия в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний. Контрольная группа (5 крыс) получала питьевую воду, соответствующую требованиям ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02. Эксперимент длился 9 мес. После выведения из эксперимента у крыс извлекалась печень, орган подвергался заливке в парафин по стандартной методике и последующей окраске гематоксилином — эозином.

Результаты и их обсуждение. При внешнем осмотре крыс, получавших с питьевой водой соединения кремния, отмечались меньшие размеры, редкая и тусклая шерсть, кожа в области хребта в петехиальных кровоизлияниях. Средняя масса крыс опытной группы составила 333 г, контрольной — 487,5 г. Отмечалось практически полное отсутствие подкожного и висцерального жира. Макропрепарат печени опытной группы визуально отличался от печени контрольной. Печень опытной группы крыс уменьшена в размерах, удельный вес ее в среднем составил 2,6%, контрольной — 3,4%. Поступление водорастворимого соединения кремния с питьевой водой приводит к следующим изменениям микроморфологии печени: печеночные дольки теряют свою «классическую» форму правильных шестиугольников, видны беспорядочно расположенные печеночные пластинки. Вместе с тем, наблюдается расширение центральных вен, стаз крови в центральных венах, выраженная клеточная инфильтрация в области воротного канала. Кроме того, обращает на себя внимание равномерное диффузное набухание синусоидных капилляров и отек перисинусоидального пространства. При подсчете клеточных элементов на поле зрения (10 полей зрения в каждом препарате) при иммерсионном увеличении (×1000) обнаружилось, что на поле зрения у крыс, получавших питьевую воду с кремнием, приходится 30–35 гепатоцитов, из них 2–3 двуядерных, 6–7 лимфоцитов, в то время как у крыс из контрольной группы на поле зрения приходится 20–25 гепатоцитов, из них 2–3 двуядерных, 5–6 лимфоцитов. Количество поперечных срезов сосудов на поле зрения составляет в среднем 4–5 у крыс контрольной группы и 6–7 у крыс подопытной группы. Обратило на себя внимание количество эозинофилов, которое 1,6 раза ($p<0,05$) увеличивается на 10 полей зрения у крыс подопытной группы.

Заключение. Поступление с питьевой водой соли кремния в течение 9 мес приводит к увеличению в поле зрения количества гепатоцитов, сосудов и эозинофилов. Обнаруженные нами особенности заостряют вопрос о характере функциональных изменений органа при данном виде воздействия.

Литература

1. *Сапожников С. П.* Эколого-биогеохимические факторы среды обитания и здоровье — Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2001.— 96 с.

2. *Сапожников С. П., Голенков А. В.* Роль биогеохимических факторов в развитии краевой патологии // Микроэлементы в медицине.— 2001.— № 2 (3).— С. 70–72.
3. *Гордова В. С., Тинюков А. Н., Тихонов Д. С., Голенкова В. А., Смирнова С. С.* К вопросу о действии водорастворимого соединения кремния, длительно поступающего в организм с питьевой водой, на лимфоидные органы // Здоровье человека в XXI веке. VIII-я Рос. науч.-практ. конф. с междунар. участ.: Сб. науч. статей. Казань, 31 марта — 1 апреля 2016 г. / Под общ. ред. проф. Ксембаева С. С.— Казань. Издательство «Бриг», 2016.— С. 617–620.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ТИМУСА МЫШИ

В. В. Гусельникова
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург
guselnicova.valeriia@yandex.ru

Целью данной работы стало изучение возрастных изменений численности, морфологии и локализации тучных клеток (ТК) тимуса мыши.

Материалы и методы. Материалом для исследования служил тимус белых нелинейных мышей (n=44). Образцы тимуса были взяты у эмбрионов 15–21 дня развития (n=28), новорожденных животных (1 день постнатального развития; n=5), половозрелых мышей (3–4 мес.; n=8) и старых животных (1,5–2 года; n=4), зафиксированы в жидкости Карнуа, обезвожены и залиты в парафин стандартным способом. Для идентификации ТК использовали коммерческий раствор толуидинового синего (БиоВитрум, Россия). Количество ТК определяли на единицу площади (1,2 мм^2) и представляли в виде среднего значения±ошибка среднего (X±s) или относительной доли (%). Полученные количественные данные обрабатывали с помощью программы Statistica (StatSoft Inc., США). Для сравнения показателей использовали однофакторный дисперсионный анализ для независимых групп (ANOVA) с последующим попарным сравнением групп с помощью критерия Тьюки. Различия считали достоверными при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. На исследованных срезах тимуса эмбрионального периода развития ТК были впервые идентифицированы на 19-й день эмбриогенеза в количестве 4,0±0,7 кл./1,2 мм^2. Эмбриональные ТК характеризовались округлой или овальной формой, сравнительно небольшими размерами (7–10 мкм) и были локализованы преимущественно в мозговом и корковом веществе тимуса в виде единичных вкраплений среди тимоцитов и эпителиальных клеток (рисунок, *а*, стрелка 1). Лишь 20% от общего количества выявлен-

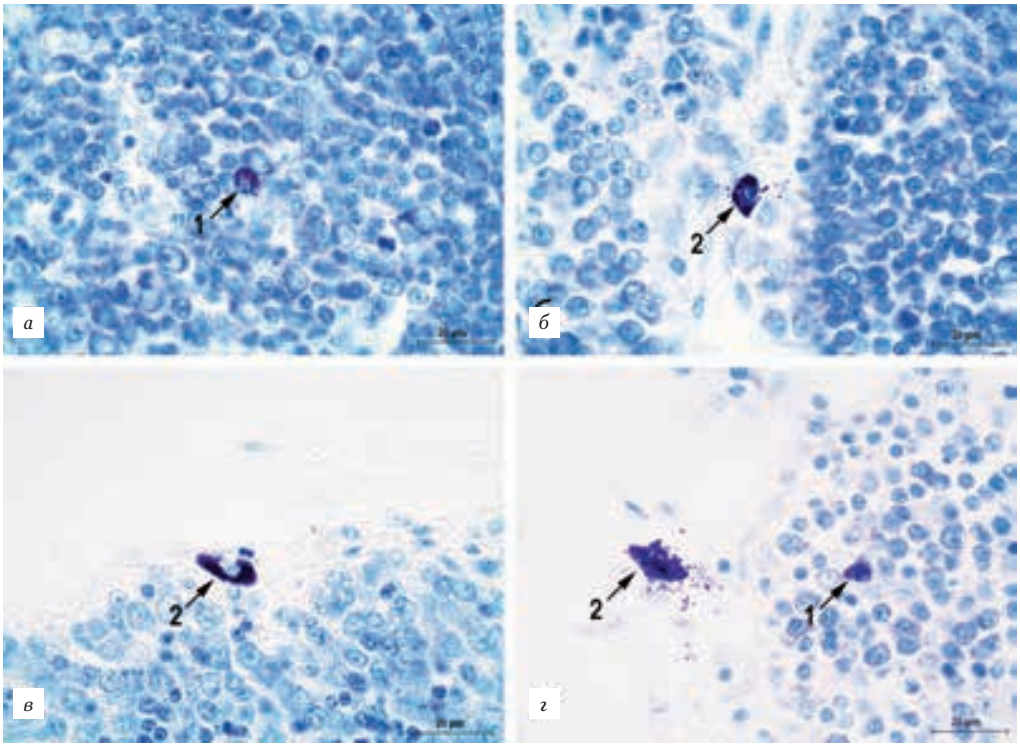


Рисунок. Тучные клетки тимуса мыши на разных стадиях онтогенеза. Обозначения: а — эмбриональный тимус; *б* — тимус новорожденного животного; *в* — тимус половозрелого животного; *г* — тимус старого животного. Стрелка 1 указывает на ТК в составе коркового вещества тимуса, стрелка 2 — на ТК в пределах капсулы. Окраска толуидиновым синим. Ув. ×100, масляная иммерсия.

ных ТК было обнаружено в пределах капсулы и септ эмбрионального тимуса. Описанные количество, локализация и морфология были характерны для ТК эмбрионального тимуса вплоть до рождения (21-й день). В тимусе новорожденных мышей количество ТК составляло 0,9±0,1 кл./1,2 мм^2, что достоверно ниже соответствующих значений, полученных при анализе других стадий онтогенеза (ρ=0,0002). Идентифицированные у новорожденных животных ТК характеризовались преимущественно овальной формой и размерами 8–12 мкм. В отличие от эмбриональных, ТК на данной стадии онтогенеза были локализованы исключительно в пределах соединительнотканной капсулы и септ тимуса и не выявлялись во внутридольковых компартментах органа (рисунок, *б*, стрелка 2). В тимусе половозрелых животных количество ТК составляло 3,91±0,45 кл./1,2 мм^2. Идентифицированные ТК имели овальную или вытянутую, реже сферическую (в широких септах) форму и сравнительно крупные размеры (15–25 мкм). На данной стадии онтогенеза ТК локализовались в пределах капсулы и соединительнотканных септ, реже — в субкапсулярном пространстве тимуса (рисунок, *в*, стрелка 2). Описанная смена локализации ТК в ходе онтогенеза — их перемещение из внутридольковых пространств эмбрионального тимуса в соединительнотканный компартмент органа у новорожденных мышей с сохранением данной локализации в тимусе половозрелых животных — может быть обусловлена формированием пространственной (и функциональной) взаимосвязи ТК с терминалями нервных волокон, наличие которой ранее было показано в пределах именно соединительнотканного компартмента тимуса [1, 2]. В тимусе старых животных количество ТК было достоверно выше, по сравнению со всеми остальными проанализированными стадиями онтогенеза (8,0±0,8 кл./1,2 мм^2; ρ=0,0002). В данном случае ТК локализовались преимущественно в пределах капсулы и септ тимуса, однако встречались также во внутридольковых пространствах органа (20% от общего количества ТК). ТК в составе капсулы и септ характеризовались теми же морфологическими характеристиками, что и ТК в тимусе половозрелых животных (рисунок, *г*, стрелка 2), в то время как внутридольковые ТК имели сравнительно небольшие размеры (7–10 мкм) и немногочисленные гранулы в цитоплазме, то есть отвечали основным характеристикам эмбриональных ТК (рисунок, *г*, стрелка 1). Обнаружение в тимусе старых животных ТК с характерными признаками эмбриональных ТК может быть свидетельством в пользу гипотезы внутритимического созревания ТК при старении.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-05093.

Литература

1. *Гусельникова В.В., Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э., Полевщиков А.В.* Тучные клетки тимуса как посредники в системе нейроиммунных взаимодействий // Мед. акад. журн.— 2013.— Т. 13, № 3.— С. 53–64.
2. Метод одновременного выявления тучных клеток и нервных терминалей в тимусе у лабораторных млекопитающих / Гусельникова В.В., Сухорукова Е.Г., Федорова Е.А., Полевщиков А.В., Коржевский Д.Э. // Морфология.— 2014.— Т. 145, № 2.— С. 70–73.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НЕЙРОНОВ ПЕРЕДНИХ РОГОВ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ В ЭМБРИОНАЛЬНОМ И РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Е. А. Колос
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

iemmorphol@yandex.ru

Введение. Процесс эмбрионального гистогенеза нервной ткани млекопитающих достаточно хорошо изучен с применением классических методов нейробиологии, авторадиографии и электронной микроскопии. Однако более информативным методом исследования является иммуногистохимический анализ, позволяющий изучать морфологические и цитохимические особенности нервных клеток и идентифицировать клеточные элементы на разных стадиях дифференцировки.

Цель настоящей работы: исследование развития нейронов передних рогов спинного мозга крысы с применением комплекса иммуногистохимических маркеров дифференцировки.

Объекты, материалы и методы. В работе использованы эмбрионы крыс Вистар с 12 по 19 сутки развития (E12–19; n=25) и новорожденные крысы (P1; n=5). Шейные отделы спинного мозга (СМ) фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [1]. Иммуногистохимические реакции проводили на парафиновых срезах, применяли мышиные моноклональные антитела к β-III-тубулину (β-III-T) (клон TU-20; Chemicon, США; 1:150), ядерному белку нервных клеток NeuN (neuronal nuclei) (клон A60; Chemicon, США; 1:400) и кроличьи поликлональные антитела к даблкортину (DCX; double cortex) (Abcam, Великобритания; 1:1600). Вторичные антитела использовали из наборов EnVision+ System HRP Labbelled Polymer Anti-mouse (Dako, Дания) и Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/DAB (Bio Genex, США). Также в работе применялись козьи поликлональные антитела к ферменту холинацетилтрансфе-

разе (ХАТ) (Chemicon, США; 1:250), кроличьи антикозьи биотинилированные антитела (Dako, Дания; 1:200) и конъюгат стрептавидин-пероксидаза (Spring Bioscience, США).

Результаты и их обсуждение. При иммуногистохимической реакции на DCX,— маркер нейробластов, на сроке Е12 у единичных клеток формирующихся передних рогов СМ наблюдается интенсивное окрашивание цитоплазмы и отдельных отростков. Через двое суток (Е14) некоторые отростки удлиняются и достигают центрального канала. В формирующихся передних рогах СМ эмбрионов 15–17 сут развития выявляется густая сеть DCX-иммунопозитивных (DCX^+) волокон. У новорожденных животных DCX^+-структуры в области передних рогов не обнаруживаются. Идентифицируются лишь отдельные иммунопозитивные волокна в задних корешках и дорзальных рогах СМ, которые являются аксонами мелких нейронов чувствительного ганглия [2]. DCX^+-волокна присутствуют также между VI–VII пластинками Рекседа. Белок -III-T является маркером молодых нейронов. В ходе настоящего исследования на 12 сут эмбрионального развития в вентральной части нервной трубки с помощью данного маркера удалось выявить лишь редкие тонкие отростки. В период Е14–17 в передних рогах СМ идентифицируется значительное количество β-III-T-содержащих отростков молодых нейронов. Волокна передних корешков также β-III-T-иммунопозитивны. После рождения количество β-III-T-содержащих волокон в области передних рогов возрастает. Ядерный белок нервных клеток NeuN — селективный маркер зрелых нейронов. Его синтез начинается в постмитотических нейронах на поздних сроках дифференцировки [3]. Нам удалось выявить NeuN, начиная с 14-х суток эмбрионального развития. У новорожденных животных данный белок присутствует в ядрах практически всех нейронов передних и задних рогов, а также в перикарионах некоторых клеток. Холинергические клетки в СМ эмбрионов крыс выявляются лишь на 13-е сутки развития. На сроке Е15 их количество увеличивается. Отростки этих клеток также содержат ХАТ и образуют густую сеть. Кроме того, экспрессия ХАТ отмечена и в области передней серой спайки. В период Е16–19, кроме передних рогов $ХАТ^+$-клетки идентифицируются в области, окружающей центральный канал от донной пластинки до пограничной борозды. Подобное распределение холинергических клеток описано в грудном отделе СМ крыс [4]. У новорожденных крыс расположение зон ХАТ-иммунореактивности соответствует спинному мозгу взрослых животных [5]. Проведенное комплексное иммуногистохимическое исследование позволило установить хронологическую последовательность экспрессии нейрональных маркеров дифференцировки в клетках передних рогов СМ крыс в пренатальный и ранний постнатальный период, что может быть использовано при изучении нарушений эмбрионального развития и при моделировании различных повреждений СМ в онтогенезе.

Литература

1. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство / Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Петрова Е. С., Карпенко М. Н., Григорьев И. П., Сухорукова Е. Г., Колос Е. А., Гиляров А. В.— СПб.: СпецЛит, 2014.— С. 119.
2. *Колос Е. А., Коржевский Д. Э.* Изучение эмбрионального гистогенеза в чувствительном ганглии заднего корешка крысы с использованием современных иммуногистохимических методов // В сб: Актуальные проблемы морфологии: эмбриональный и репаративный гистогенез, филогистогенез.— СПб.: Издательство СПбГПМУ, 2014.— С. 65–68.
3. *Сухорукова Е. Г., Кирик О. В., Зеленкова Н. М., Коржевский Д. Э.* Нейрональный ядерный антиген NeuN — показатель сохранности нервной ткани и пригодности ее для иммуногистохимического исследования // Мед. акад. журн.— 2015.— Т. 15, № 1.— С. 63–67.
4. *Phelps P. E., Barber R. P., Vaughn J. E.* Embryonic development of choline acetyltransferase in thoracic spinal motor neurons: somatic and autonomic neurons may be derived from a common cellular group // J. Comp. Neurol.— 1991.— Vol. 307.— P. 77–86.
5. *Колос Е. А., Коржевский Д. Э.* Формирование холинергических нейронов спинного мозга крыс в пренатальный и ранний постнатальный период развития // Сб.: Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии.— М.: Издание Института морфологии человека, 2014.— С. 218–220.

КОМПЕНСАТОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОЧКЕ, ОСТАВШЕЙСЯ ПОСЛЕ ОДНОСТОРОННЕЙ НЕФРЭКТОМИИ, ПРИ ВВЕДЕНИИ В ОРГАНИЗМ КОНЦЕНТРАТА ПОЛИФЕНОЛОВ ВИНОГРАДА

О. И. Лященко, А. А. Жукова, С. Н. Смирнова, Э. А. Джапеш

Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, Республика Крым, Россия

olgacrimea2014@mail.ru

Введение. По данным ряда авторов [1, 2], единственная почка встречается с частотой от 1:610 до 1:2000. Количество операций с односторонним удалением почки составляет 14–27% от общего числа оперативных вмешательств в урологии [2]. Среди пациентов с единственной почкой высок риск развития почечной недостаточности,— при динамическом наблюдении в течение 5 лет хроническая почечная недостаточность развивается в 6–34% случаев [3]. Многие факторы, влияющие на компенсаторно-приспособительные механизмы в един-

ственной почке, остаются неизученными. Поэтому очень важна проблема исследования регенерационных процессов в оставшейся почке, а также влияния различных биологически активных веществ на усиление компенсаторно-адаптационных процессов в оставшейся почке.

Цель исследования: изучить влияние концентрата полифенолов винограда «Эноант» на развитие компенсаторно-адаптационных процессов в единственной почке, оставшейся после односторонней нефрэктомии.

Объекты, материалы и методы. Для экспериментальных исследований было использовано 40 трехмесячных белых крыс (самцов и самок) массой 160–200 г в двух сериях: 1) удаление левой почки при сохранении правой (контроль); 2) удаление левой почки при сохранении правой с послеоперационным ежедневным одноразовым внутрижелудочным зондовым введением концентрата полифенолов винограда «Эноант» (опыт). Работу с лабораторными животными осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (1977 г.) и Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985 г.). Взятие и фиксацию гистологических образцов производили после декапитации животных под легким эфирным наркозом. Морфологические исследования проводились через 7, 14 и 30 сут после операции. Микропрепараты окрашивали гематоксилином — эозином по стандартной методике. Исследование микропрепаратов проводили на специализированном компьютерном комплексе MICRO-C4-2200 (микроскоп Olympus CX31; Olympus, Япония). В ходе исследований оценивались следующие параметры отделов нефрона: площадь поперечного среза почечного тельца, площадь поперечного среза проксимального и дистального извитого канальца.

Результаты и их обсуждение. После удаления одной почки в оставшейся почке развиваются закономерные изменения её структуры. Так, к 30-м суткам эксперимента выявлено увеличение массы почек на 71,8%, по сравнению с контрольными крысами. Отмечена гипертрофия отделов нефрона. Площадь сосудистых клубочков достигала 4029,28±2,13 мкм^2 ($p<0,01$), а почечных телец — 6116,03±2,36 мкм^2 ($p<0,01$). В связи с этим площадь просвета капсулы клубочков достоверно возросла (до 2087,72±4,86 мкм^2; $p<0,001$). Применение полифенолов винограда после оперативного вмешательства ускорило темпы развития и степень компенсаторной гипертрофии изучаемого органа у подопытных животных, а также позитивно повлияло на состояние микроциркуляторного русла почки. Через 30 сут после операции отмечалось увеличение массы почек, средняя масса которых составила 0,953±0,063 г, и была на 82% выше показателя контроля. Отмечалась выраженная гипертрофия отделов нефрона. Площадь сосудистых клубочков составляла 4097,38±2,53 мкм^2 ($p<0,01$), а почечных телец — 6187,11±2,54 мкм^2 ($p<0,01$). Соответственно, площадь просвета капсулы клубочков была увеличена,— до 2107,65±2,32 мкм^2 ($p<0,001$). Объем интерстициального пространства к 1-му месяцу после операции в корковом веществе увеличился. Отмечалось утолщение стенок междольковых артерий при неизмененном их просвете. Междольковые вены не были расширены. Ткани мозгового вещества почки выглядели интактными.

Заключение. На основании результатов проведенного исследования можно утверждать следующее: 1) в единственной интактной почке после односторонней нефрэктомии происходят процессы поэтапного развития компенсаторной гипертрофии органа; 2) применение полифенолов винограда после оперативного вмешательства ускоряет темпы и степень развития компенсаторной гипертрофии изучаемого органа в эксперименте у подопытных животных на всех этапах становления компенсаторной гипертрофии единственной почки.

Литература

1. *Трапезникова М. Ф.* Опухоли почек.— М., 1978.
2. *Дерюгина Л. А.* Обоснование тактики урологических оперативных вмешательств на единственной почке у детей в зависимости от ее компенсаторно-приспособительных реакций: автореф. дис. … канд. мед. наук. М., 1991.
3. *Пугачев А. Г., Кудрявцев Ю. В., Ларионов И. Н., Чумаков А. М.* Выбор вида операции при гидронефрозе у детей // Урология и нефрология.— 1996.— № 3.— С. 3–5.

РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АСТРОЦИТОВ ПРИЛЕЖАЩЕГО ЯДРА ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ОГРАНИЧЕНИЯ КРОВОТОКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

[1]*Н.Г.Наумов*, [2]*А.В.Дробленков*

[1]Городская больница № 15, Санкт-Петербург

[2]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

ngnaumov@gmail.com

Введение. Распространенной моделью ишемических повреждений головного мозга является модель с перевязкой обеих общих сонных артерий. При этом центр ишемии захватывает передний мозг, кровоснабжение которого значительно ограничивается, поскольку он получает кровь через коллатеральные сосуды из позвоночных артерий. Животные выживают в течение 2–4 нед, если их не подвергать стрессу [1]. В течение этого времени по результатам неврологиче-

ских и биохимических тестов устанавливают эффективность антигипоксантов и нейропротекторов. Реактивные изменения клеток прилежащего ядра переднего мозга (ПЯ), расположенного в центре частичной ишемии, не изучались.

Цель исследования: установить реактивные изменения астроцитов головного мозга, расположенных в области выраженного ограничения кровотока.

Объекты, материалы и методы. Опыты выполнены на самцах крыс Вистар массой 200–220 г, возрастом 4 мес. Подопытных крыс (4 особи) фиксировали на станке, под эфирным наркозом препарировали и лигировали обе общие сонные артерии. Рану обрабатывали антисептиком и зашивали. У ложнооперированных крыс (4 особи, контроль) воспроизводили все этапы операции без перевязки артерий. Через 7 сут животных декапитировали, головной мозг фиксировали в 9%-м растворе нейтрального формалина, готовили фронтальные парафиновые срезы ПЯ толщиной 3 мкм (в области между передней спайкой и обонятельными ядрами). Срезы окрашивали крезиловым фиолетовым по Нисслю, выявляли глиальный фибриллярный кислый белок астроцитов (GFAP) с использованием мышиных моноклональных антител (клон GA-5; Biocare medical, США; 1:250). Вторичные антитела применяли из набора VECTASTAIN ABC, США. После проявления связанных антигенов диаминобензидином срезы докрашивали гематоксилином. Строение астроцитов изучали в 7 последовательных квадратах площадью 0,01 мм^2 у каждого животного в группе (n=28). Устанавливали количество клеток, расстояние между их телами и стенкой капилляра в пределах окружности радиусом 20 мкм, площадь тел клеток и длину их главных отростков. Определяли глиоцито-нейрональный индекс как отношение числа клеток-сателлитов к числу жизнеспособных нейронов (малоизмененных, гипохромных набухших и сморщенных гиперхромных). Морфометрию проводили с помощью программы Imagescope (Электронный анализ, Россия). Определяли среднее арифметическое, ее стандартную ошибку и среднеквадратическое отклонение. О значимости различий судили по величине t-критерия Стьюдента и считали их значимыми при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Тела нейронов и астроцитов ПЯ ложнооперированных крыс находились на разном расстоянии от стенки кровеносных капилляров, клетки-сателлиты были единичными. GFAP в телах астроцитов имел строение непрерывной рыхлой тонкопетлистой сети и часто образовывал сгущение в виде одной-двух глыбок. Экспрессия GFAP в отростках и глиальных периваскулярных мембранах была непрерывной. Через 7 сут ишемии определялось большое количество измененных форм нейронов: «клеток-теней», гиперхромных сморщенных и набухших гипохромных; тела многих нейронов, астроцитов и олигодендроцитов группировались вблизи стенки кровеносных капилляров. Тела астроцитов были набухшими, их площадь, в сравнении параметром в контроле, возросла ($p<0,05$). Ядрышко располагалось вблизи ядерной оболочки. GFAP часто концентрировался в основании главных отростков, длина которых сократилась ($p<0,05$). В периваскулярных мембранах GFAP был более тонким, чем в контроле и в ряде ее участков отсутствовал. Расстояние между телами астроцитов и стенкой капилляров сократилось, глиоцито-нейрональный индекс возрос ($p<0,05$). Количество астроцитов после ишемии значительно не изменилось. Среди них, несмотря на особенности положения в системе «капилляр–астроцит–нейрон», теневидные и сморщенные формы отсутствовали. Выявленные изменения нейронов и астроцитов являются следствием токсических реакций глютамат-кальциевого каскада, которые запускаются в фокусе ишемии [2] и коррелируют с данными ультраструктурных изменений клеток [3]. Авторы наблюдали расширение полостей органелл, матрикса митохондрий и деструкцию клеточных мембран, что ведет к утрате внутриклеточной жидкости и сморщиванию клетки.

Выводы. Астроциты более устойчивы к ишемическому повреждению, чем нейроны. Они испытывают набухание, деструкцию промежуточных филаментов в телах, периферических частях отростков и периваскулярных глиальных мембранах. Формирование нейроно-глио-васкулярных комплексов представляет собой защитный механизм и условие выживания клеток при ишемии.

Литература

1. *Шабанов П.Д., Зарубина И.В., Soultanov V.S.* К механизму действия полипренолов при ишемии головного мозга // Мед. акад. журн.— 2011.— Т. 11, № 2.— С. 24–31.
2. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга.— М: Медицина, 2001.— 328 с.
3. *Caltana L., Merelli A., Lazarowski A., Brusco A.* Neuronal and glial alterations due to focal cortical hypoxia induced by direct cobalt chloride (CoCl2) brain injection // Neurotox. Res.— 2009.— Vol. 15, № 4.— P. 348–358.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЛИПОФУСЦИНА, ВЫЯВЛЯЕМОГО В МИОКАРДЕ ЧЕЛОВЕКА

И. М. Плешакова
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

laylay.96@mail.ru

Введение. В настоящее время известно, что липофусцин (ЛФ) представляет собой многокомпонентную субстанцию, накапливаемую преимущественно в долгоживущих клетках животных с возрастом [1]. Большинство исследований ориентировано на изучение ЛФ в клетках сетчатки глаза человека, а также в клетках головного мозга млекопитающих.

Предметом данного исследования был ЛФ кардиомиоцитов человека. Ранее было установлено, что ЛФ миокарда имеет двухкомпонентный спектр автофлуоресценции с максимумами излучения в красном и жёлтом участках спектра. В этих исследованиях возбуждение люминесценции осуществлялось излучением ртутной лампы, проходящим светофильтры, что не обеспечивает достаточной монохроматичности света [2].

Цель исследования: изучение автофлуоресценции ЛФ в миокарде человека с использованием для её возбуждения когерентного излучения.

Материалы и методы. В работе использовались парафиновые срезы миокарда людей разного пола и возраста (n=4); № 1 — женщина, 94 года; № 3 — женщина, 91 год; № 2 — мужчина, 24 года; № 4 — мужчина, 55 лет. Материал был получен из архива Лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы ФГБНУ «ИЭМ». Материал, хранившийся в виде парафиновых блоков, был фиксирован в 10%-м формалине, обезвожен и залит в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью ротационного микротома Leica (Leica, Германия) и наклеивали на предметные стекла (Menzel-Gläser, Германия). После депарафинирования и регидратации препараты были заключены в безводную среду Cytoseal XYL (Thermo Scientific, Германия). Исследование производилось с помощью конфокального лазерного микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Все образцы облучались лазером, с длиной волны 405 нм в одинаковых условиях. Обработку полученных изображений и построение спектральных кривых проводили в компьютерной программе LSM Image Browser (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и их обсуждение. *Образец № 1.* Полученные графики зависимости интенсивности автофлуоресценции от длины волны представляют собой кривые, незначительно отличающиеся друг от друга. Самые высокие пики графиков находятся в синей и зелёной областях спектра. Пики меньшей высоты принадлежат красной, оранжевой и жёлтой областям.

Образец № 2. Полученные графики зависимости интенсивности автофлуоресценции от длины волны представляют собой кривые, незначительно отличающиеся друг от друга. Самые высокие пики графиков находятся в голубой и зелёной областях спектра, после чего наблюдается резкий спад интенсивности до низких значений в жёлтой, оранжевой и красной областях спектра.

Образец № 3. Полученные графики зависимости интенсивности автофлуоресценции от длины волны представляют собой кривые, незначительно отличающиеся друг от друга. Самые высокие пики графиков находятся в зелёной и оранжевой областях спектра. Пики меньшей высоты принадлежат жёлтой и красной областям спектра. В синей и голубой областях спектра наблюдается малоинтенсивная автофлуоресценция, по сравнению с другими областями.

Образец № 4. Полученные графики зависимости интенсивности автофлуоресценции от длины волны представляют собой кривые, незначительно отличающиеся друг от друга. Самые высокие пики графиков находятся в синей и голубой областях спектра. Пики с меньшим значением интенсивности занимают зелёную область спектра. После них наблюдается резкий спад интенсивности: в жёлтой, оранжевой и красной областях спектра значения интенсивности малы, по сравнению со значениями интенсивности пиков синей и голубой областей.

Полученные в ранних исследованиях спектры автофлуоресценции ЛФ миокарда имели один широкий пик, охватывающий жёлтую и красную области спектра [2]. Похожая картина была получена в данном исследовании при изучении образцов № 1 (94 г.) и № 3 (91 г.). Но графики автофлуоресценции образцов № 2 (24 г.) и № 4 (55 л.) выглядят иначе, т. к. не имеют пиков в жёлтой и красной областях спектра. На основе полученных результатов можно предположить, что с возрастом ЛФ меняет свою структуру (или состав), что смещает максимумы его автофлуоресценции от синей и голубой к красной области спектра. Однако неизменным остаётся компонент, люминесценция которого находится в зелёной области спектра.

Заключение. На основании полученных результатов можно заключить, что 1) в каждом образце автофлуоресценция имеет пики интенсивности в зелёной области спектра, 2) с возрастом пики интенсивности автофлуоресценции ЛФ смещаются от синей и голубой областей спектра к жёлтой и красной областям.

Литература

1. *Вертушков В. Т.* Липофусцины в животных организмах // Усп. совр. биологии.— 1977.— Т. 83.— С. 359–363.
2. *Татарюнас А. Б., Карнаухов В. Н.* Люминесцентные спектральные характеристики липофусциновых гранул в тканях человека // Арх. патологии.— 1980.— № 9.— С. 51–61.

КОМПЛЕКСНЫЙ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ФЕНОТИПА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭПИТЕЛИО-МЕЗЕНХИМНОГО ПЕРЕХОДА *IN VITRO*

А. А. Цитрина
Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия

sashulka.s@gmail.com

Введение. Эпителио-мезенхимным переходом (ЭМП) называют процесс смены клеточного фенотипа, сопровождающийся разрушением межклеточных контактов, изменением осей полярности и паттерна молекулярных маркеров

клетки. В результате такого рода перестроек, клетки приобретают способность к миграции и инвазии в окружающие ткани. Процесс сопровождается активацией различных ферментов, участвующих в разрушении белков внеклеточного матрикса и синтезе его новых компонентов [1–3]. TGF-β является основным индуктором программы ЭМП; как правило, его действие модулируется другими цитокинами и ростовыми факторами [1, 3]. Выделяют несколько основных маркеров программы ЭМП, экспрессия которых в наибольшей мере изменяется под действием TGF-β. К таким маркерам относятся белки межклеточных контактов — E- и N-кадгерины, белок промежуточных филаментов виментин, компонент внеклеточного матрикса фибронектин, а также HAS2 и CD44-рецептор гиалуроновой кислоты, соответственно. Также отмечаются серьезные перестройки актинового цитоскелета клеток и остановку клеточного цикла преимущественно в фазе G1 [4]. Однако комплексная оценка большого количества маркеров на белковом уровне является довольно трудной задачей в силу неоднородности ответа клеточной популяции на внешние стимулы. В случае ЭМП клеточный ответ зависит не только от концентрации действующих веществ, но и от плотности клеточной популяции, положения клетки в составе клеточного пласта и наличия свободного края клетки.

Цель исследования: разработка комплексного метода оценки фенотипических изменений клеточной популяции с помощью иммуногистохимии и флуоресцентной микроскопии.

Материалы и методы. Все эксперименты проведены на культуре иммортализованных кератиноцитов человека HaCaT. Запуск программы ЭМП осуществляли при помощи комбинированного воздействия двух факторов роста: TGF-β (Peprotech, 100–35B) и рекомбинантного EGF (ПанЭко, ФР-08100), в концентрации 5 нг/мл и 10 нг/мл, соответственно, в течение 3 сут. Для иммуногистохимического исследования использовались антитела к HAS2 (Santa Cruz, sc34068; 1:300), CD44 (BD Pharmingen, 553132; 1:300), и Phalloidine-647 (Invitrogen; 1:500). Ядра окрашивали красителем Hoechst 33342 в концентрации 1 мкг/мл. Первичные антитела выявляли с помощью donkey-anti goat Alexa Fluor 488 (Invitrogen, ab150129; 1:800) и Streptavidin Alexa Fluor 594 (Invitrogen, S11227; 1:500). Зафиксированные и окрашенные клетки анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI6000 с использованием соответствующих светофильтров. Статистическую обработку полученных изображений осуществляли с помощью программы Cell Profiler (Broad Institute of MIT & Harvard, США).

Результаты и их обсуждение. После инкубации клеток со смесью факторов роста, отмечается отсутствие делящихся клеток в экспериментальной группе. Средняя площадь таких клеток увеличивается в три раза, по сравнению с контролем. Происходит остановка клеточного цикла преимущественно в фазе G1. При анализе популяции клеток, стимулированных смесью факторов роста, наблюдается смещение распределения интенсивности периферического актина, что свидетельствует о разборке межклеточных контактов. Однако общая интенсивность актина возрастает практически в три раза, что связано с перестройкой цитоскелета клетки и формированием стресс-фибрилл. Общая интенсивность флуоресценции HAS2 в клетках, обработанных факторами роста, была в 2,6 раза выше, чем в контрольных клетках. Флуоресценция CD44 также повышалась примерно в 2,3 раза в стимулированных клетках. Также значительно менялась его локализация. В контрольных клетках CD44 наблюдался преимущественно на плазмалемме, особенно много его детектировалось в области межклеточных контактов. После стимуляции основная масса белка представлена во внутриклеточных везикулах. На основании всех перечисленных данных нами проведена комплексная оценка изменения экспрессии некоторых белков в клеточной популяции при стимуляции смесью факторов роста.

Заключение. Согласно полученным данным, уровень интегральной интенсивности флуоресцеции HAS2, CD44 и периферического демонстрируют наиболее значительные изменения при реализации программы ЭМП в линии иммортализованных кератиноцитах человека.

Работа поддержана РФФИ (№ 16-34-00769).

Литература

1. *Moustakas A., Heldin P.* TGFβ and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition // Biochim. Biophys. Acta.— 2014.— Vol. 8.— P 2621–2634.
2. *Radisky E. S., Radisky D. C.* Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.— 2010. –Vol. 15.— P. 201–212.
3. *Zhang J., Tian X. J., Xing J.* Signal Transduction Pathways of EMT induced by TGF-β, SHH, and WNT and their crosstalks // J. Clin. Med.— 2016.— Vol. 5.
4. *Zhang P., Sun Y., Ma L.* ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance // Cell Cycle.— 2015.— Vol. 14.

ЕС-КЛЕТКИ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ ПРИ ГОЛОДАНИИ И РАЦИОНЕ С ИЗБЫТКОМ ЖИРОВ

М. Л. Чуркова, О. В. Иванова, С. В. Костюкевич, И. Е. Макаренко
Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия
mariya.churkova@szgmu.ru

Введение. Изменение рациона питания сопровождается приспособлением организма к новым условиям. Продолжительное голодание [1] или же наоборот преобладание в рационе жирной пищи [2] приводит к изменению структу-

ры эпителия толстой кишки. Наибольшие изменения затрагивают эндокринный аппарат толстой кишки [1–4], в частности, ЕС-клетки.

Цель: исследование количественного содержания ЕС-клеток в эпителии слизистой оболочки ободочной кишки экспериментальных животных при голодании и рационе с повышенным содержанием жиров.

Объекты, материалы и методы. Все экспериментальные манипуляции проводились с соблюдением принципов гуманности. 10 крыс (самцы в возрасте 5 мес., с массой тела на момент начала исследования: 170±3 г) голодали в течение 7 сут, контролем служили 10 крыс, получавших обычное питание. Все животные получали воду *ad libitum*. Массу тела крыс измеряли на 1-е, 5-е и 7-е сутки. Материал кишки забирали на 5-е и 7-е сутки голодания. 5 нелинейных мышей (самки в возрасте 8 нед., с массой тела на момент начала исследования: 28±2,5 г) содержались на рационе, состоящем из высококалорийной диеты с 45% жиров, в течение 21 нед. Контролем служили 5 мышей, получавших обычное питание. Животным еженедельно измеряли массу тела, проводили биохимическое определение концентрации глюкозы. На 21-й неделе производили забор материала кишки. Материал среднего отдела ободочной кишки (1–2-й опыт) на каждом сроке исследования брали от 5 животных. Полученные срезы для выявления ЕС-клеток окрашивали по методу Массон–Гамперля. Количество клеток подсчитывали с использованием окулярной морфометрической сетки в 100 полях зрения. Статистическую обработку количественных показателей проводили с использованием программ пакета «Statistica 10» с учетом значимости различий по критерию Манна–Уитни при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. В 1-е сутки исследования масса тела голодавших животных (170±4,5 г) была сопоставима с показателями контрольной группы и составляла 168±3,8 г. К 7-м суткам масса тела животных, не получавших питания (119±6,8 г), по сравнению с интактными крысами (170±5,0 г), уменьшилась на 30%. При исследовании количества ЕС-клеток в эпителии слизистой оболочки ободочной кишки на 5-е сутки была отмечена тенденция к их увеличению, по сравнению с контролем (86±2,3 кл./мм^2), достоверное же увеличение наблюдалось на 7-е сутки исследования: 97,2±4,3 кл./мм^2. Полученные результаты сопоставимы с литературными данными [1]. При определении концентрации глюкозы в крови у экспериментальных животных, содержавшихся на рационе с 45% жиров, к 21-й неделе отмечено достоверное повышение ее уровня до 6,9±0,3 ммоль/л, по сравнению с интактными мышами (6,7±0,4 ммоль/л). Масса тела у животных, содержавшихся на высококалорийной диете, и у мышей контрольной группы достоверно не изменилась (интактные животные: 30,6±3,6 г; эксперимент: 32,4±1,3 г). При изучении количественного содержания ЕС-клеток у экспериментальных мышей, содержавшихся на рационе с 45% жиров, было отмечено достоверное уменьшение их числа (62,5±7,6 кл./мм^2; $p=0,02$), по сравнению с интактными мышами (91,4±6,2 кл./мм^2). Данные сопоставимы с результатами, полученными при содержании крыс на «западной диете» (содержание жиров 32%) [2].

Заключение. Увеличение количества ЕС-клеток при голодании и уменьшение их числа при содержании животных на рационе с преобладанием жиров свидетельствует о вовлечении данной популяции клеток в реакции местного гомеостаза при действии этих патологических факторов.

Литература

1. *Иванова В. Ф., Пузырев А. А., Костюкевич С. В., Драй Р. В.* Структурные изменения в стенке кишки крыс при голодании // Морфология.— 2009.— Т. 136, № 6.— С. 62–68.
2. Serotonin availability in rat colon is reduced during a Western diet model of obesity / Bertrand R. L., Senadheera S., Tanoto A., Tan K. L., Howitt L., Chen H., Murphy T. V., Sandow S. L., Liu L., Bertrand P. P. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.— 2012.— Vol. 303, № 3.— P. G424–G434.
3. *Иванова В. Ф., Топанова А. А., Авалуева Е. А.* Ультраструктурные изменения слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки при патологии // Морфология.— 2014.— Т. 145, № 3.— С. 80.
4. *Иванова О. В., Левинская М. Ю., Перевозчикова Н. Г.* Эндокринные клетки эпителия прямой кишки при клинической патологии // Морфология.— 2008.— Т. 133, № 2.— С. 52.

КЛИНИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

ИНФЕКЦИОННЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

А. Ф. Байбулатова, Б. А. Бакиров
Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Уфа, Россия
bakirovb@gmail.com

Введение. Основной причиной летальных исходов пациентов с заболеваниями системы крови и кроветворных органов на фоне проведения специфической терапии является проблема органных нарушений. К органным нарушениям на фоне развития неспецифического стресса относятся дыхательная, сердечно-сосудистая, почечная и печеночная недостаточность [1]. Актуальность изучения данной проблемы обусловлена прямой связью развития синдрома полиорганной недостаточности с увеличением стоимости и длительности лечения, а также риска летального исхода.

Одним из проявлений полиорганной недостаточности является сепсис [2, 3]. Инфекционные осложнения являются основной непосредственной причиной высокой летальности у 75% больных с гемобластозами. По данным авторов у 80% больных инфекционные осложнения развиваются на фоне нейтропении, что осложняет проведение специфической терапии. Основная проблема у данной группы больных в критическом состоянии это сепсис-индуцированный синдром полиорганной недостаточности [4].

Целью исследования является изучение частоты развития инфекционных осложнений и сепсиса у пациентов с заболеваниями системы крови и оценка эффективности антибактериальной терапии.

Материалы и методы исследования. Исследование включает 138 больных с гематологическими заболеваниями (94 (68,1%) женщины и 44 (31,9%) мужчины), которые проходили лечение в ГБУЗ Республиканской клинической больницы им. Г. Г. Куватова (г. Уфа) в период с февраля 2009 по декабрь 2011 года. Средний возраст пациентов составил 28,7 лет. Пациенты с онкогематологическими заболеваниями получали различные схемы химиотерапии с последующим переводом в блок интенсивной терапии. Наиболее распространенным диагнозом был острый лейкоз 88 (63,8%) пациентов с острым миелобластным лейкозом, 34 (24,6%) пациента с острым лимфобластным лейкозом). Другие заболевания (апластическая анемия, хронические лейкозы и миелодиспластический синдром) были диагностированы у 16 (11,6%) пациентов. Средняя продолжительность терапии до перевода в палату интенсивной терапии (ПИТ) составила 7 дней. Среднее пребывание в ПИТ составила 15,5 дней.

Для лечения больных с сепсисом применяли антибиотики широкого спектра действия: карбапенемы (имипенем+циластатин, меропенем) в 45% случаев, цефалоспорины IV (цефепим) в 21% случаев, пенициллины (амок-сициллин+клавулановая кислота, пиперацилин, пиперациллин+тазобактам, тикарциллин+клавулановая кислота) в 18% случаев, фторхинолоны (ци-профлоксацин, пефлоксацин) в 5% случаев, цефалоспорины III (цефопера-зон+сульбактам) в 11% случаев. В 48% случаев к проводимой антибактериальной терапии добавляли ванкомицин или линезолид, в 52% — аминогликозиды. В 56% случаев к проводимой антибактериальной терапии мы добавляли противогрибковые препараты (вориконазол, каспофунгин, амфотерицин или флуконазол).

Результаты и их обсуждение. Сепсис диагностирован у 26 (18,8%) из 138 больных, поступивших в ПИТ. Возбудитель сепсиса идентифицирован в 34% случаев. К основными грамположительными возбудителями относились метициллинрезистентные золотистые стафилококки (MRSA) и энтерококки, а среди грамотрицательных микроорганизмов были выделены — *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*. Инфекционные очаги в виде пневмонии, стоматита и энтерита были выявлены лишь у 21 больного. Результаты посевов крови положительные у 34% больных. Назначение эмпирической антибактериальной терапии в течение 3–4 дней приводило к улучшению их состояния, нормализации температуры, прогноз у 7 пациентов был благоприятным. Одним из первых признаков начала инфекционного осложнения у всех больных было появление лихорадки, наступающей через несколько дней после развития аплазии костного мозга. Сроки от появления лихорадки до развития сепсиса колебались от нескольких часов до 3 недель (в среднем, 6,1±0,3 дней). У пациентов без признаков инфекции концентрация прокальцитонина составила 0,46±012 нг/мл; при развитии синдрома системно-воспалительной реакции составила 5,3±0,2 нг/мл. Концентрация прокальцитонина при тяжелом сепсисе составляла 25,1±0,3 нг/мл.

Назначаемые схемы антибактериальной терапии оказались эффективными у 29,8% пациентов. Антибактериальная терапия была неэффективна у 69,2% больных. Количество курсов антибактериальной терапии не отличалось при тяжелом сепсисе и септическом шоке — 2,3±0,4.

Заключение. При применении наиболее современных препаратов и оптимальных схем их назначения только в трети случаев антибактериальная терапия сепсиса оказывается эффективной.

Литература

1. *Белобородов В. Б.* Проблемы антибактериальной терапии тяжелых инфекций на примере нозокомиальной пневмонии, связанной

с проведением искусственной вентиляции легких, и сепсиса // Русский медицинский журнал.— 2012 — № 6 — с. 286.
2. *Галстян Г. М.* Септический шок и острая дыхательная недостаточность в гематологической клинике // Диссертация доктора медицинских наук.— М.— 2003.— с. 304.
3. *Зильбер А. П.* Цитокиновые каскады и новая концепция критического состояния при септическом шоке // В кн. «Актуальные проблемы критических состояний».— 1995.— с. 137–149.
4. *Кассиль В. Л.* Полиорганная недостаточность // Проблемы гематологии и переливания крови.— 1995.— № 2.— С. 45–49.

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Д. С. Бомбоева, О. И. Иванова
Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого, Россия
Box_darima@mail.ru

Введение. Заболеваемость злокачественными новообразованиями в Красноярском крае и РФ составляет порядка 340 на 100 тыс. населения, смертность — около 180 на 100 тыс. населения. Гнойно-воспалительные осложнения остаются наиболее частыми и тяжелыми среди всех осложнений, возникающих у онкологических больных в процессе лечения, и причина летальности в 39,3–42,8% случаев. Чаще всего осложнения имеют нозокомиальную природу и вызываются микроорганизмами, обладающими высокой резистентностью к антибиотикам. В связи с этим, мониторинг возбудителей и их антибиотикорезистентности является основой эмпирической и рациональной антимикробной химиотерапии онкологических больных [1, 2].

Цель исследования: изучение антибиотикорезистентности микрофлоры гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных с целью выбора тактики эмпирической терапии и профилактики.

Материалы и методы исследования. В 2014–2015 гг. обследовано 66 пациентов отделения анестезиологии-реанимации КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А. И. Крыжановского». Было изучено 66 образцов и выделено 96 культур микроорганизмов. При анализе полученных данных обследуемые были разделены на две группы. Первая группа — 44 пациента, у которых забор материала проводился из нижних дыхательных путей. Вторая группа — 22 пациента, у которых материал получен из раневого отделяемого гнойных очагов брюшной полости. Выделение и идентификацию культур проводили в соответствии со стандартными методиками. Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона с использованием дисков OXOID, (США). Продукцию β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) определяли на среде Мюллера-Хинтона методом «двойных дисков» (МУК 4.2.1890–04) и с использованием набора дисков компании MAST, (UK).

Результаты и их обсуждение. В составе микрофлоры отделяемого нижних дыхательных путей преобладают неферментирующие грамотрицательные бактерии — 44,4%, преимущественно представленные *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* (46,9%, 43,8%). На долю энтеробактерий приходится 16,6%. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* доминировали *Klebsiella pneumoniae* — 41,6% и *Escherichia coli* — 25%. Грамположительные микроорганизмы выявлены в 25,1% случаев и представлены родами *Staphylococcus*, *Enterococcus*. Прочие микроорганизмы составили 13,9%.

При исследовании раневого отделяемого установлено, что в составе микрофлоры так же преобладают неферментирующие грамотрицательные бактерии (41,6%). Данная группа представлена *P. Aeruginosa* — 50,0% и *A. Baumannii* — 50,0%. Среди энтеробактерий, доля которых составляет 29,2%, доминировали *K. Pneumoniae* — 57,1% и *E. Coli* — 21,6%. Удельный вес грамположительных микроорганизмов составил 29,2%.

По результатам оценки чувствительности к антибиотикам *A. baumanii* и *P. aeruginosa* установлена их крайне высокая устойчивость, в том числе к карбаменемам. Изоляты *A. baumanii* чувствительны только к тобрамицину, а *P. Aeruginosa* — к тобрамицину и амикацину. Основным механизмом резистентности энтеробактерий является продукция БЛРС (*K. pneumoniae* 100%, *E. coli* 60%). Представители обоих видов энтеробактерий чувствительны к имипенему и меропенему в 100% случаев.

Заключение. Актуальными возбудителями гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных отделения анестезиологии-реанимации являются грамотрицательные полирезистентные микроорганизмы (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*). Наиболее эффективными антибиотиками с учетом этиологии гнойно-воспалительных осложнений являются карбапенемы и аминогликозиды 3 поколения, полимиксины.

Литература

1. *Дмитриева Н. В., Петухова И. Н., Смолянская А. З.* Инфекционные осложнения в онкологической клинике // Практическая онкология.— 2001.— № 1.— С. 18–20.
2. *Давыдов М. И., Дмитриева Н. В.* Инфекции в онкологии // Практическая медицина.— 2009.— № 4.— 472 с.

АНТИБИОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *ESCHERICHIA COLI* СЕКРЕТА СЛЮННЫХ КЛЕТОК *HIRUDO MEDICINALIS* – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА, НЕ ВЫЗЫВАЮЩЕГО АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

[2]*Го Даньян*, [1]*И. Б. Павлова*

[1]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия

[2]Китайско-российский центр биоинженерии и биотехнологий, Китайско-Российский технопарк, Чанчунь, КНР

guody@mail.ru

Введение. В настоящее время резистентность микроорганизмов к противомикробным препаратам, и, прежде всего — к антибиотикам (антибиотикорезистентность — АР), стремительно расширяется, превратившись в глобальную мировую проблему. С целью решения последней изучают активность антимикробных пептидов (АМП) — альтернативу традиционно используемым лекарственным средствам. Однако часто препятствием для лечебного применения ряда АМП является их высокая гемолитическая активность и токсичность. Исследование путей преодоления АР доказало, что только комбинация нескольких АМП не вызывает АР у патогенов. Причём, активность смеси двух и более АМП часто возрастает, благодаря синергизму [1]. Поэтому всё больше внимания уделяют изучению природных, эволюционно сбалансированных комплексов биологически активных веществ, содержащих АМП. Особое место среди таких комплексов занимает секрет слюнных клеток медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* (ССК) — основной гуморальный агент, в первую очередь обеспечивающий высокую эффективность используемого с древности лечения пиявками — гирудотерапии (ГТ). ССК не токсичен и не вызывает гемолиз эритроцитов. Важнейшим его свойством справедливо считают уникальную противотромботическую активность, когда проявляется фибринолитический и множество других эффектов ГТ, обусловленных, в первую очередь, многофункциональным комплексом ССК [2]. Антибиотический эффект ССК, также весьма значимый при ГТ, пока изучен недостаточно. Установлено, что ССК обладает высокой антимикробной активностью широкого спектра, причём, часто он способен подавлять развитие ряда микроорганизмов, нечувствительных к лизоциму — активному компоненту врождённого иммунитета [2, 3]. Среди последних известен *Staphylococcus aureus*, устойчивый к лизоциму благодаря модификации его пептидогликана О-ацетилтрансферазой, вызывающий заболевания разной степени тяжести (вплоть до стафилококкового сепсиса), всё более опасные из-за широкой АР этого возбудителя. Расширяется также и АР ряда штаммов *Escherichia coli*.

Цель нашей работы — сравнительное изучение антибиотического влияния ССК на *S. aureus* и *E. coli*.

Материалы и методы. Отбирали нативный, свободный от примесей, ССК от *H. medicinalis*, выращенных на биофабрике и купленных в аптеке, известным, описанным ранее способом [3]. Работу проводили с культурами *S. aureus* штамм 144 и *E. coli* штамм 52 из Музея культур кафедры микробиологии МГУ. Бактерии выращивали при 37° С в течение суток на агаризованной питательной среде состава (г/л): K_2HPO_4 — 7,0; KH_2PO_4 — 2,0; цитрат натрия — 0,4; $MgSO_4$ — 0,05; $(NH_4)_2SO_4$ — 1,0; H_2O дист. К среде добавляли 10 г/л триптозного бульона и 10 г/л глюкозы; при выращивании стафилококков также добавляли 100 г/л NaCl. В среды вносили 15 г/л агара («Sigma» или «Difco», США). Определение антибиотической активности ССК в физиологическом растворе проводили, контролируя подавление роста клеток в жидкой среде, а также методом диффузии в агар [3]. Исследовали с помощью сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии (СЭМ и ТЭМ) препараты клеток после их обработки ССК, которые готовили общепринятыми методами. СЭМ и ТЭМ проводили на микроскопах JSM-6380 (Япония) при ускоряющем напряжении 20 кV, и Geol JEM 1011 при ускоряющем напряжении 80 кВ, соответственно [3].

Результаты и их обсуждение. Растворы ССК подавляют рост исследуемых бактерий (таблица). Клетки *E. coli* почти полностью лизируются уже через 3 ч действия на них ССК (его минимальная ингибирующая концентрация — МИК, составила 4,5 мкг/мл). Признаки лизиса этих клеток (в СЭМ и ТЭМ) под влиянием ССК сходны с признаками, изученными нами у *Pseudomonas aeruginosa* [3]. Минимальная концентрация раствора ССК, подавляющая рост *S. aureus* (МПК) составила 35 мкг/мл. Более половины стафилококков через 7 ч действия на них в жидкой среде 2 МПК (70 мкг/мл) ССК не способны к росту. Изменение ультрамикроструктуры клеток *S. aureus* под влиянием ССК начинается с септы, образующейся при их делении. ТЭМ показала, что этот самый молодой участок под влиянием ССК становится в 2–4 раза шире остальной части клеточной стенки, его электронная плотность уменьшается, при этом нарушается и прилегающая к нему цитоплазматическая мембрана.

Заключение. В работе показана способность ССК оказывать прямой бактерицидный и/или бактериостатический эффект на патогенные бактерии.

Литература

1. *Yu G., Baeder D. Y., Regoes R. R., Rolff J.* Combination Effects of Antimicrobial Peptides // Antimicrob Agents Chemother. — 2016.— Vol. 60, № 3.— P. 1717–1724.
2. *Баскова И. П.* Научные основы гирудотерапии. Гуморальное звено. Тула: Аквариус, 2015–228 с.

3. Изучение перспектив использования секрета слюнных клеток медицинской пиявки Hirudo medicinalis и препарата «Пиявит» как антимикробных комплексов, не вызывающих резистентности у микроорганизмов / Павлова И. Б., Юдина Т. Г., Баскова И. П., Го Даньян, Чен Л. Ч., Феоктистова Н. А., Васильев Д. А., Золотухин С. Н. // Современные проблемы науки и образования.— 2015.— № 2. URL: http://www.science-education.ru/131-23637.

ВЫЯВЛЕНИЕ ХИТИНОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ *VIBRIO CHOLERAE* O1 И O139 В СУБСТРАТНОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ

С. Н. Козлов, Е. Ю. Марков, Л. Я. Урбанович, Э. Г. Гольдапель, Л. В. Миронова
Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия

ejimei@mail.ru

Введение. Хитиназы (EC. 3.2.1.14) — группа ферментов, ответственных за гидролиз β-1,4 гликозидных связей хитина — природного биополимера, являющегося главным структурным компонентом экзоскелета ракообразных, представителей зоопланктона и клеточных стенок большинства патогенных грибов [1]. Продукты гидролиза хитина являются важным источником азота, углерода и энергии для многих представителей морских бактерий, включая *Vibrio cholerae*, что имеет определённое значение для персистенции возбудителя холеры в объектах окружающей среды [2]. У холерных вибрионов обнаружено шесть генов, кодирующих синтез и экспрессию хитиназ. Из них наибольшее значение придаётся гену *chi*A, поскольку прослеживается корреляция между наличием этого гена и развитием заболевания у человека [3]. На это косвенно указывают сведения о неодинаковой вирулентности штаммов *V. cholerae*, различающихся по степени удельной хитинолитической активности. Наиболее целесообразным методом для изучения состава хитиназ является зимографический анализ, позволяющий выявлять наличие и состав гидролаз без их предварительного выделения и очистки.

Цель работы заключалась в выявлении внутриклеточных и секретируемых хитинолитических ферментов в препаратах субклеточных фракций и культуральных фильтратов, полученных из штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп разного происхождения посредством электрофореза в полиакриламидном геле с использованием гликольхитина в качестве специфического субстрата с контролем исследуемых штаммов на присутствие генов, кодирующих хитиназы.

Материалы и методы исследования. В работе использовали 10 штаммов *V. cholerae* O1 и O139 разного эпидемического происхождения. Бактерии культивировали на мясо-пептонном агаре (pH 7,8) при 37° С в течение двух суток и смывали физраствором, центрифугировали при 10 000 об/мин, супернатанты и осадки лиофилизировали. Суточную культуру смывали физиологическим раствором, определяли концентрацию взвеси и помещали во флаконы с мясо-пептонным бульоном (pH 7,6), с тем расчётом, чтобы в 1 мл содержалось 2×10^8 м. к. Через 2 ч инкубации при комнатной температуре во флаконы с бактериальной взвесью добавляли с целью обеззараживания мертиолят натрия с конечной концентрацией 0,01% и инкубировали их в течение двух суток на холоде. Все последующие манипуляции осуществляли после контроля материала на специфическую стерильность. Далее проводилось центрифугирование материала при 10 000 об/мин, супернатант (бесклеточная культуральная жидкость) подвергали диализу и лиофильному высушиванию. Субклеточные фракции — наружные мембраны (НМ) и мочевинные экстракты (МЭ) — получали лизисом живых клеток 4,5 М раствором мочевины с проверкой на специфическую стерильность и последующим дифференциальным центрифугированием, после чего их диализовали и лиофильно высушивали.

Зимографический анализ проводили электрофорезом в 8%-м полиакриламидном геле с 0,1%-м гликольхитином («Sigma», США) по методу J. Trudel и A. Asselin [4]. О наличии хитиназной активности судили по образованию прозрачных зон гидролиза на фоне денатурированного субстрата. Наличие гена *chi*A2 определяли методом ПЦР с использованием специфических праймеров chi F — CAYGAYCCRTGGGCWGC и chi R — ACRTCTTCAATCTTGTC [5].

Результаты и их обсуждения. Зимографически показано, что большинство взятых в работу штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп обладают хитиназной активностью (рисунок *а*, *б*). Сравнительный зимографический анализ препаратов культуральных фильтратов и субклеточных фракций штаммов холерного вибриона разной эпидемической значимости выявил межштаммовые различия в спектре активных хитиназ. Среди культуральных фильтратов менее активными оказались клинические штаммы холерных вибрионов, имевшие 2 высокомолекулярные полосы гидролиза гликольхитина, в то время как водные штаммы характеризовались наличием 7 полос гидролиза (рис. *а*). У препаратов субклеточных фракций (мочевинные экстракты) более активными оказались водные (нетоксигенные) штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы, среди препаратов наружных мембран клинические штаммы O139 серогруппы (рис. Б). Интересно отметить, что три *chi*A^+ штамма холерного вибриона — *V. cholerae eltor* O1 И-1334, *V. cholerae eltor* O1 И-1263, и *V. cholerae eltor* O1 2–01 отличились отсутствием полос хитиназ на электрофореграммах, в то время как у остальных штаммов он определялся, что было подтверждено энзим-электрофорезом.

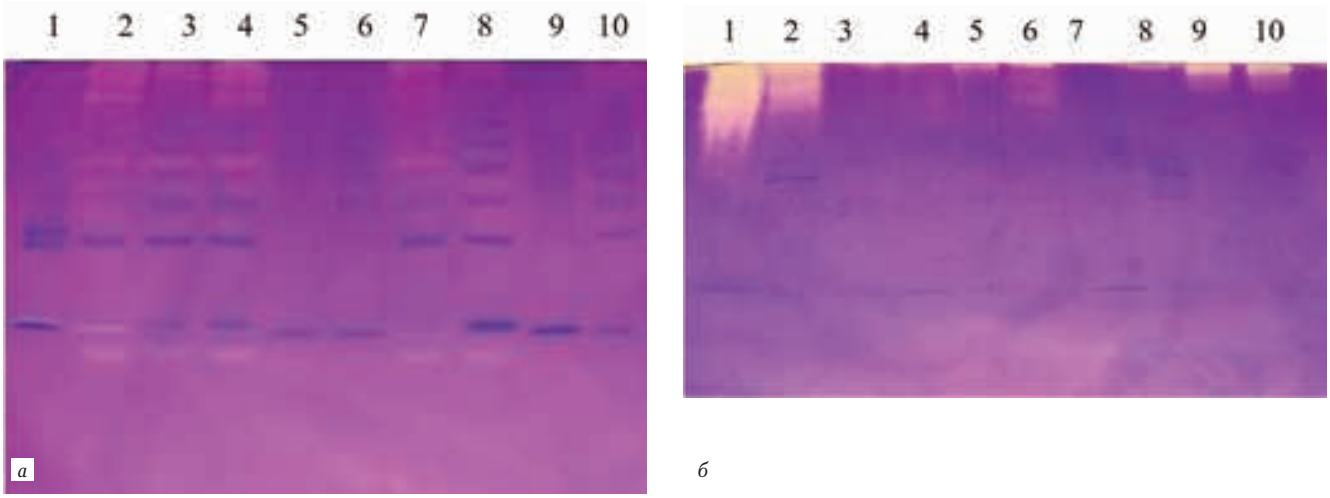


Рисунок. *а* — Хитиназная активность экстрацеллюлярных хитиназ штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп разной эпидзначимости в 8%-м полиакриламидном геле с 0,01% м гликольхитином. 1. *V. cholerae eltor* O1 M878; 2. *V. cholerae eltor* O1 И 1300; 3. *V. cholerae eltor* O1 129–05 B; 4. *V. cholerae eltor* O1 И 1368; 5. *V. cholerae eltor* O1 И 1334; 6. *V. cholerae eltor* O1 И 1263; 7. *V. cholerae eltor* O1 И 638; 8. *V. cholerae eltor* O1 И 680; 9. *V. cholerae eltor* O1 2–01; 10. *V. cholerae* O139 И 12. *б* — Энзим электрофорез препаратов субклеточных фракций штаммов *V.cholerae* O1 и O139 серогрупп разного происхождения с 0,1% м гликольхитином в качестве субстрата. Окраска 0,1% м раствором Кумасси ярко синим R 250. 1 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 M878; 2 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 И 1300; 3 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 129–05 B; 4 — НМ *V. cholerae eltor* O1 И 1368; 5 — НМ V. cholerae eltor O1 И 1334; 6 — НМ *V. cholerae eltor* O1 И 1263; 7 — НМ *V. cholerae eltor* O1 И 638; 8 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 И 680; 9 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 2–01; 10 — МЭ *V. cholerae eltor* O139 И 12.

Таким образом, в качестве первого самостоятельного и наглядного этапа детекции, идентификации, и частичной характеристики как внутриклеточных, так и секретируемых гидролитических ферментов холерного вибриона O1 и O139 серогрупп разного происхождения выбран метод энзим-электрофореза в полиакриламидном геле с инкорпорированным гликольхитином (зимография). Выбор метода частично был обусловлен тем, что на данном этапе возможно изучение спектра и состава ферментов без процедуры их выделения, с параллельной задачей первоначального скрининга ферментативно активных штаммов холерного вибриона выделением определённого фермента и выяснением его роли и вклада в патогенность (вирулентность) возбудителя. Известно, что холерный вибрион обладает широчайшим диапазоном ферментативной активности, во многом обусловливающей и придающей ему конкурентоспособность, а также играющей определяющую роль в адаптации к неблагоприятным факторам окружающей среды. Обнаруженные различия в спектре активных хитиназ, заключающиеся в превосходящей ферментативной активности водных нетоксигенных штаммов по сравнению с клиническими токсигенными можно объяснить более высоким адаптационным потенциалом нетоксигенных штаммов вследствие экспрессии этих ферментов, что согласуется с данными других исследователей [3]. Выявленные различия в ферментативных спектрах субклеточных фракций и культуральных фильтратов, вероятно, связаны с преобладанием секретируемых ферментов. Учитывая, что использованный в настоящем исследовании деацилированный гликольхитин является субстратом для хитобиаз (EC 3.2.1.10), можно предположить, что в данном случае были детектированы ферменты класса хитобиаз.

Заключение. Субстратный электрофорез выявил количественные и качественные различия по составу хитиназ холерных вибрионов в зависимости от происхождения штамма.

Литература

1. *Patil R. S., Ghormade V. V., Deshpande M. V.* Chitinolytic enzymes: an exploration // Enzyme Microbial. Technol.— 2000.— Vol. 26, № 7 — P. 473–483.
2. Хитин и продукты его гидролиза в экологии Vibrio cholera / Марков Е. Ю., Куликалова Е. С., Урбанович Л. Я., Вишняков В. С., Балахонов С. В. // Биохимия.— 2015.— Т. 80, № 9.— С. 1334–1343.
3. The Vibrio cholerae extracellular chitinase ChiA2 is important for survival and pathogenesis in the host intestine / Mondal M., Dhrubajyoti N., Hemanta K., Dhira R. S., Nabendu S. C. // PLOS ONE.— 2014.— Vol. 9, № 9 — e103119.
4. *Trudel J., Asselin A.* Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis // Anal. Biochem.— 1989.— Vol. 178, № 2 — P. 362–366.
5. Molecular epidemiology of O139 Vibrio cholerae: mutation, lateral gene transfer, and founder flush / Garg P., Aydanian A., Smith D., Morris J. G., Nair J., Balakrish G. S., Colin O. // Emerg. Infect. Dis.— 2003.— Vol. 9, № 7.— P. 810–814.

ВЫЯВЛЕНИЕ НУКЛЕАЗ И ЛЕЦИТИНАЗ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ МЕТОДОМ СУБСТРАТНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

С. Н. Козлов, Е. Ю. Марков, Л. Я. Урбанович

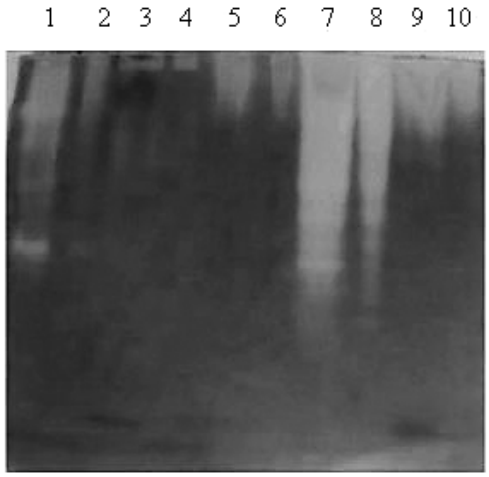
Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Россия

ejimei@mail.ru

Введение. Микробные нуклеазы (EC. 3.1.26.3 — EC 3.1.21.1) — это большая группа гидролитических ферментов, ответственная за разрушение двухцепочечных молекул РНК и ДНК бактерий. Они выполняют множество функций, связанных с регуляцией процесса роста и деления бактериальной клетки, транскрипционным контролем уровня экспрессии белков, способствующих адгезии в организм-хозяина (макроорганизм) [1], а также гидролизом sРНК, контролирующих процессы постоянства состава наружных мембран [2], формированием биоплёнок [3], и активацией экспрессии сигнальных генов вирулентности [4]. Данные о наличии, составе и характеристике нуклеаз у холерного вибриона практически отсутствуют за исключением сообщения о белке YbeY, обладающего свойствами РНК-азы, регулирующим способность к колонизации и биоплёнкообразованию у *Vibrio cholerae* [5]. Лецитиназы (EC 3.1.14-EC 3.1.15) — это семейство ферментов, гидролизующих фосфорные связи в молекуле фосфолипидов, секретируются многими патогенными бактериями и обладают цитотоксическим эффектом [6]. У холерного вибриона также обнаружена лецитиназная активность, однако сведений о составе лецитиназ в доступной литературе также не обнаружено. Одним из наиболее наглядных и информативных способов, позволяющих определить наличие и состав гидролаз, является субстратный электрофорез в полиакриламидном геле (зимография), так как применение других стандартных подходов не даёт объективного представления о межштаммовых различиях и, следовательно, не даёт возможность провести косвенную оценку патогенного потенциала штаммов *V. cholerae* по спектру изучаемых ферментов.

Цель работы: детекция РНК-аз и лецитиназ в препаратах субклеточных фракций и культуральных фильтратов штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп с помощью субстратной зимографии.

Материалы и методы исследования. В работе использовано 11 штаммов *V. cholerae eltor* O1 и 2 штамма *V. cholerae* O139 серогруппы, выделенных во время эпидосложнений от больных холерой (*V. cholerae eltor* И-1263, И-1298, И-1300, И-1334, И-1342, И-1337, *V. cholerae* O139 И-12) и в благополучный по холере период (И-638, 129–05-В, И-1368, И-680, 2–01, *V. cholerae* O139 И-16). Препараты культуральных фильтратов получали выращиванием бактерий на жидкой питательной среде с обеззараживанием 0,01% мертиолятом натрия с последующим центрифугированием и лиофилизацией. Субклеточные фракции (наружные мембраны (НМ) и мочевинные экстракты (МЭ)) получали лизисом живых клеток 4,5 М раствором мочевины с последующим дифференциальным центрифугированием и лиофилизацией, после чего полученные препараты подвергали зимографическому анализу. Зимографический анализ проводили посредством электрофореза в 8% ПААГ, содержащего дрожжевую РНК и α-лецитин в конечной концентрации 0,1% (w/v). О наличии гидролитической активности судили по образованию прозрачных полос гидролиза на фоне окрашенного субстратного геля. Анализ зимо-



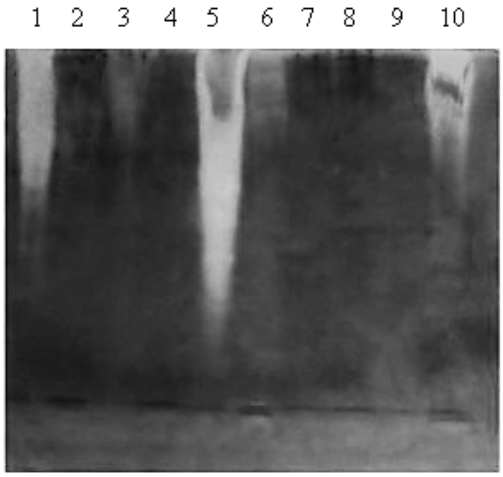


Рисунок. Зимографическая детекция РНК-аз и лецитиназ в 8%-м субстратном ПААГ в препаратах субклеточных фракций из штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп разного происхождения и эпидемической значимости: *а* — РНК-азная активность (окраска толуоидиновым синим). 1 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 M 878; 2 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 129–05-B; 3 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1263; 4 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-638; 5 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 2–01; 6 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1369; 7 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1342; 8 — МЭ *V. cholerae* 569B; 9 — МЭ *V. cholerae* O139 И-12; 10 — МЭ *V. cholerae* O139 И-16; *б* — Лецитиназная активность (окраска Coomassie Brilliant Blue R-250). 1 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 M 878; 2 — НМ *V. cholerae eltor* O1 И-638; 3 — НМ V. cholerae eltor O1 И-1263; 4 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 129–05-B; 5 — НМ V. cholerae eltor O1 И-1342; 6 — НМ *V. cholerae eltor* O1 M 800; 7 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1327; 8 — МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1407; 9 — МЭ *V. cholerae* O139 И-12; 10 — НМ *V. cholerae* O139 И-16.

грамм проводили с использованием системы гель-документирования Gel-Doc XR$^+$ и компьютерной программы Image Lab 2.01 («Bio-Rad», США).

Результаты и обсуждение. Зимографический анализ показал, что большинство взятых в работу препаратов из штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, обладает РНК-азной и лецитиназной активностью. Отмечено, что в отличие от препаратов НМ все препараты МЭ *V. cholerae* обладают РНК-азной активностью, причём их активность в отношении РНК была неодинаковой и, по-видимому, зависела от токсигенности штаммов. Так, РНК-азная активность препаратов МЭ из токсигенных *V. cholerae eltor* O1 была заметно выше (проявление полос более диффузное и интенсивное) по сравнению с препаратами МЭ из нетоксигенных вибрионов (рис. *а*).

При изучении лецитиназной активности установлено, что лецитиназной активностью обладают преимущественно препараты НМ холерного вибриона, причём у препаратов НМ *V. cholerae eltor* O1 И-1342 и O139 И-16 она проявилась в виде диффузной полосы с молекулярной массой от 50 до 120 кДа и от 80 до 120 кДа, у препаратов НМ *V. cholerae eltor* M 800 и *V. cholerae* O1 И-1263 проявились дополнительные низкомолекулярные полосы, лежащие в районе 25 кДа. Препараты МЭ *V. cholerae eltor* O1 129–05-B, *V. cholerae eltor* O1 И-1327, *V. cholerae eltor* O1 И-1407 и *V. cholerae* O139 И-12 лецитиназной активностью не обладают, за исключением МЭ *V. cholerae eltor* M 878, лецитиназная активность которого проявилась также в виде диффузной полосы с молекулярной массой от 60 до 120 кДа (рис. *б*). Установлено, что активность препаратов НМ *V. cholerae eltor* O1 2–01 и НМ *V. cholerae eltor* O1 И-638 была слабее активности препарата НМ *V. cholerae eltor* O1 2131, проявившейся в виде диффузной полосы от 60 до 120 кДа.

Заключение. Выявленные статистически достоверные более высокие показатели нуклеазной активности у препаратов, полученных из токсигенных штаммов, указывают на вклад данных ферментов в вирулентность возбудителя. Сравнительный анализ активности препаратов субклеточных фракций и культуральных фильтратов показал, что в частности активность фосфолипаз (лецитиназ) препаратов НМ выше, чем препаратов МЭ, что согласуется с литературными данными.

Литература

1. *Heroven A. K., Dersch P.* RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene rovA, controls cell invasion, virulence and motility of Yersinia pseudotuberculosis // Mol. Microbiol.— 2006.— Vol. 62.— P. 1469–1483.
2. *Papenfort K., Vogel J.* Regulatory RNA in bacterial pathogens // Cell Host Microbe.— 2010.— Vol. 8.— P. 116–127
3. *Zhao X., Koestler B. J., Waters C. M., Hammer B. K.* Post- transcriptional activation of a diguanylate cyclase by quorum sensing small RNAs promotes biofilm formation in Vibrio cholerae // Mol. Microbiol.— 2013.— Vol. 89.— P. 989–1002.
4. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in Listeria monocytogenes / Johansson J., Mandin P., Renzoni A., Chiaruttini C., Springer M., Cossart P. // Cell.— 2002.— Vol. 110.— P. 551–561.
5. The highly conserved bacterial RNase YbeY is essential in Vibrio cholerae, playing a critical role in virulence, stress regulation, and RNA processing / Vercruysse M., Kohrer C., Davies B. W., Arnold M. F. F., Mekalanos J. J., RajBhandary U. L., Walker G. C. // Plos Pathog.— 2014.— Vol. 10, № 6.— e1004175.
6. *Thelestam M., Mollby R.* Sensitive assay for the detection of toxin-induced damage to the cytoplasmic membrane of human diploid fibroblasts // Infect. Immun.— 1975.— Vol. 12.— P. 225–232.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ИЗУЧЕНИЕ РАЗРУШЕНИЯ МАТРИКСА БИОПЛЕНКИ ПАРОДОНТАЛЬНОГО КАРМАНА

Н. Э.Колчанова, В. К.Окулич, В. Е.Шилин

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Беларусь

natali.kolchanova777@gmail.com

Введение. Значительная распространенность заболеваний пародонта среди населения и отсутствие тенденции к их снижению — одна из актуальных проблем современной стоматологии [1]. К настоящему времени на смену концепции планктонных форм микробного возбудителя заболеваний пародонта пришли теории ассоциации микробных сообществ — биоплёнок [2]. Такая форма существования предоставляет бактериям массу преимуществ в условия воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина. Несмотря на очевидную актуальность, недостаточно известно о подборе методов эффективного воздействия на бактерии ротовой полости, находящиеся в составе биопленок и методах их определения.

Цель: разработать метод определения биопленки на основе флуоресценции и изучить разрушение матрикса биопленки пародонтального кармана.

Материалы и методы исследования. С целью изучения пародонтальной микрофлоры нами было обследовано 77 пациентов с хроническим пародонтитом. Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью тест-систем на автоматизированном биохимическом анализаторе ATB EXPRESSION® (Биомерье, Франция). Микроскопические исследования проводили с помощью

лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SPE с программным обеспечением LAS AF.

Результаты и их обсуждение. При микробиологическом исследовании содержимого пародонтальных карманов у всех пациентов выделены и идентифицированы микроорганизмы 13 различных видов, при этом *Streptococcus oralis* был обнаружен в составе 25% исследуемых образцов.

Для определения способности данного штамма к образованию биопленки был использован спектрофотометрический метод и разработанный нами метод на основе флуоресценции с использованием DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), основанный на связывании красителя с двухцепочечной ДНК в составе биопленки [3, 4]. Для разработки метода за основу был взят стандартный способ идентификации биопленки с использованием генцианвиолета. В качестве красителя использовали флуоресцентный DAPI, измерение оптической плотности проводили на спектрофлуориметре Solar CM2203. Для оценки эффективности метода на основе флуоресценции была изучена способность образования биопленки у 12 штаммов из выделенных ранее микроорганизмов. Коэффициент корреляции (r) со стандартной методикой составил 0,97 ($p<0,05$). В дополнение к предшествующей методике значения оптической плотности, полученные на спектрофотометре, переводили в вес микробной биопленки в расчете на одну лунку 96-луночного планшета для ИФА. Масса биопленки 10 штаммов *S. oralis*, выделенных от разных пациентов, колебалась от 0,012 до 0,030 мкг на лунку.

Визуализация биопленки с помощью конфокальной микроскопии и программного обеспечения LAS AF с использованием флюоресцентного красителя DAPI выявила характерную для биопленок трехмерную организацию. Толщина двухсуточной биопленки *S. oralis* колебалась от 50 до 60 мкм.

Для оценки способности антисептиков и ферментов расщеплять экзополимерный матрикс биопленки использовалась суспензия матрикса биопленки *S. oralis*, меченная Congo-red [3]. В ходе анализа полученных данных установлено, что из изученных антисептиков наибольшей активностью 1,33±0,03 мг обладает диметилсульфоксид 25%-й, активность которого проявляется в первые секунды взаимодействия; менее активны были цетилпиридиния хлорид, перекись водорода 3%-я, хлоргексидина биглюконат 2%-й. Антисептики, у которых не было выявлено активности: септомирин (мирамистин), хлоргекседина биглюконат 0,05%-й, гипохлорит натрия 3%-й, фурациллин и йодиксин. Среди ферментов наибольшая активность наблюдалась у гиалуронидазы I: 0,2±0,004 мг, оптимальное время экспозиции 20 с. Меньшей способностью разрушать матрикс биопленки обладали протеиназа К, альфа-ДНКаза, гиалуронидаза III, пепсин, рибонуклеаза, лизоцим, альфа-амилаза. При комбинации ферментов наблюдали снижение их активности.

Заключение. Разработан метод определения биопленки на основе флуоресценции и оценена биомасса микробной биопленки *S. oralis in vitro*, позволяющие стандартизировать формирование и изучение микробных сообществ. Построена 3D-модель биопленки *S. oralis*, установлено, что она имеет сложную трехмерную структуру толщиной от 50 до 60 мкм.

Установлено, что среди антисептиков наиболее эффективно разрушает биопленку, образованную *S. oralis*, диметилсульфоксид 25%-й. Среди исследованных ферментов наибольшая активность наблюдалась у гиалуронидазы I типа, что, вероятно, связано с расщеплением гиалуроновой кислоты матрикса биопленки.

Литература

1. *Борисенко Л. Г.* Диагностика и комплексное лечение заболевании периодонта : учеб.-метод. пособие / Л. Г. Борисенко, Е. А. Мирная.— Минск: БГМУ, 2014.— С. 63.
2. *Манак Т. Н.* Микрофлора полости рта и ее роль в развитии заболеваний периодонта / Т. Н. Манак // Стоматол. журн.— 2012.— Т.XIII, № 3.— С. 178–181.
3. *Колчанова Н. Э.* Определение образования микробнои биопленки бактериями периодонтального кармана и ее устоичивости к химическим и биологическим объектам / Н. Э. Колчанова и др. // Иммунопатология, аллергология, инфектология.— 2015.— № 3.— С. 56–61.
4. *Колчанова Н. Э.* Метод индикации биопленки, продуцируемой микроорганизмами, с использование флуориметрии / Н. Э. Колчанова [и др.] // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 68-й итог. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Витебск, 2016 г.— Витебск: ВГМУ, 2016.— С. 426–427.

МОРФОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Е. В. Король

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия

vari2@sprint-v.com.ru

Введение. Возбудитель мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei* обладает значительной генетической пластичностью, позволяющей ему выживать в условиях окружающей среды, а также длительно персистировать в организме. В настоящее время существует мнение, что во внешней среде этот микроорганизм сохраняется в биотических объектах, в том числе, в простейших. В работе Inglis описана возможность выживания *B. pseudomallei* в *Acatamoeba*

spp. [1]. На примере других микроорганизмов показано, что их упаковка в клетках простейших имеет значение для механизмов адаптационной изменчивости, при этом с большей частотой происходят рекомбинационные процессы, формируется резистентность к различным ингибиторам, антибиотикам, изменяется вирулентность [2].

Целью нашей работы было пассирование *B. pseudomallei* в клетках инфузории вида *Tetrahymena pyriformis* и изучение фенотипических свойств культур микроорганизма, выделенных после пассажа.

Материалы и методы исследования. *B. pseudomallei* культивировали в клетках *T. pyriformis*, используя в качестве среды речную воду и L бульон. Параллельно проводили пассирование микроорганизма в аналогичных средах в отсутствии тетрахимен. Культуры *B. pseudomallei*, ассоциированные с тетрахименами, и контрольные образцы инкубировали в течение 3 суток в климатической камере при температуре 28° С до образования цист, начала их разрушения и выхода микроорганизма во внешнюю среду. Полученный материал осаждали центрифугированием, отмывали средой для пассирования и планктонную культуру вновь соединяли с культурой тетрахимен. После проведения 15 пассажей культуры высевали на среду Эшдауна для получения изолированных колоний. Посевы инкубировали не менее 4–7 суток при 32° С. Колонии фотографировали, особенности морфологических вариантов колоний и их соотношение в различных пробах определяли при анализе фотографий.

Результаты и их обсуждение. В результате выделили 5 морфотипов колоний, которые, в соответствии с классификацией Chantratita [3], были обозначены как I, II, III, IV, VI. При этом культура исходного штамма *B. pseudomallei* 110 была отнесена к морфотипу VI с присутствием в незначительном количестве (около 5%) морфотипа IV. Исследование колоний в различных образцах показало варьирование морфотипов, в зависимости от среды пассирования (вода, вода с тетрахименами, L бульон, L бульон с тетрахименами), а также различные соотношения морфологических вариантов в каждом образце. Так, в средах, содержащих клетки *T. pyriformis*, в подавляющем большинстве обнаруживались колонии исходного VI варианта. Кроме того, из сокультур с тетрахименами был выделен IV морфотип, также характерный для исходного исследуемого штамма *B. pseudomallei* 110. Морфотипические варианты *B. pseudomallei* 110, отличались от исходного штамма по некоторым фенотипическим свойствам. В частности, I и IV морфотипы демонстрировали наличие полной гемолитической активности в сравнении с остальными морфологическими вариантами. Эти же морфотипы отличались повышенной протеолитической активностью. Кроме того были выявлены различия в подвижности исследованных морфотипов. Максимальной подвижностью отличался I тип, достаточно высокие показатели наблюдались у исходного штамма и VI морфотипа, тогда как IV морфотип был наименее подвижным.

Все 5 морфотипов *B. pseudomallei* 110 обладали сниженной вирулентностью для лабораторных животных по сравнению с исходным вариантом. Мыши линии BALB/c, зараженные культурами полученных диссоциативных вариантов, не погибали в срок наблюдения 30 суток, и от них не выделялась культура, тогда как гибель контрольной группы отмечалась в течение 4–6 суток. Вирулентность морфотипов также была существенно снижена для золотистых хомячков. Необходимо отметить, что в организме животных происходило переключение каждого из исследованных морфотипов в морфотип I, характерный для клинических изолятов.

Заключение. Таким образом, фенотипическая изменчивость *B. pseudomallei* 110 при пассировании в различных условиях проявлялась в формировании нескольких морфологических типов колоний, что указывало на феномен переключения исходного VI морфотипа, свойственного данному штамму, в ряд других морфологических вариантов I, II, III и IV типов. Отметим, что присутствие инфузорий в стрессовых условиях способствовало более стабильному сохранению исходного морфотипа интернированных в них бактерий. Морфотипы отличались от исходного штамма рядом фенотипических свойств, таких как протеазная, гемолитическая активность, подвижность. Кроме того, все полученные морфологические варианты характеризовались сниженной вирулентностью для лабораторных животных. Дальнейшее изучение феномена переключения будет направлено на установление молекулярных механизмов адаптации возбудителя мелиоидоза к различным стрессовым воздействиям, в том числе, адаптации внутри макрофагов и персистенции в макроорганизме.

Литература

1. Interaction between Burkholderia pseudomallei and Acanthamoeba species results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape / Inglis T. J., Rigby P., Robertson T. A., Dutton N. S., Henderson M., Chang B. J. // Infection & Immunity.— 2000.— Vol. 68.— P. 1681–1686.
2. *Denoncourt A. M., Paquet V. E., Charette S. J.* Potential role of bacteria packing by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria // Front. microbiol.— 2014.— Vol. 5.— P. 204.
3. Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by Burkholderia pseudomallei / Chantratita N., Wuthiekanun V., Boonbumrung K., Tiyawisutsri R., Vesaratchavest M., Limmathurotsakul D., Chierakul W., Wongratanacheewin S., Pukritiyakamee S., White N. J. // J Bacteriol.— 2007.— Vol. 189.— P. 807–817.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТ ШТАММОВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА

Н. А. Николаева, Г. Е. Брилль, А. В. Егорова
Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского Министерства здравоохранения РФ, Россия

meduniv@sgmu.ru

Введение. В организме человека практически нет органа или ткани, которые были бы устойчивы к действию токсинов золотистого стафилококка. Стафилококк остается наиболее частой причиной возникновения внутрибольничных инфекций при несоблюдении надлежащих санитарных правил [1].

Лечение стафилококковых инфекций вызывает серьезные трудности из-за нарастающей лекарственной устойчивости возбудителя и появления полирезистентных штаммов [2, 3]. Последнее диктует необходимость поиска новых немедикаментозных методов лечения стафилококковых поражений.

В настоящей работе показана принципиальная возможность подавления роста различных штаммов золотистого стафилококка светом низкоинтенсивного красного лазера с длиной волны 660 нм.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования использовались клетки золотистого стафилококка двух клинических штаммов: метициллин-чувствительного (MSSA) и метициллин-резистентного (MRSA). Для облучения культур микроорганизмов применялся полупроводниковый лазер, генерирующий излучение красной области спектра в непрерывном режиме. Плотность мощности составляла 100 мВт/см^2, энергетическая экспозиция — 30, 60, 90 и 180 Дж/см^2. Лазерному воздействию подвергалась взвесь бактериальных клеток, находящаяся в соответствующих ячейках. Последовательно увеличивалась доза облучения за счет возрастания продолжительности фотовоздействия. Оценка влияния излучения на микроорганизмы производилась путем подсчета числа выросших колоний. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы *GraphPad Prism-5* с использованием *U*-теста Манна-Уитни. Достоверными считали различия средних при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Результаты проведенных исследований представлены в таблице (таблица).

Как следует из таблицы, при выращивании стафилококкового штамма MSSA в контроле (без облучения) среднее число колоний, образуемых микробом на питательной среде, составило 373,6±46,2. После предварительного облучения микробных клеток светом красного лазера в дозах от 30 до 90 Дж/см^2 заметного изменения числа колоний не наблюдалось ($0,5<p>0,1$). Однако при увеличении суммарной дозы облучения до 180 Дж/см^2 имело место достоверное снижение числа образующихся колоний в 1,5 раза, то есть отмечался отчетливый бактериостатический эффект ($p<0,02$).

Среднее число колоний бактериальных клеток в опытах с резистентным штаммом золотистого стафилококка (MRSA) в контроле составляло 320,6±69,9 ($p>0,5$ с соответствующим контролем метициллин-чувствительного штамма). Лазерное облучение взвеси бактериальных клеток уже в минимальной использованной дозе (30 Дж/см^2) вызывало отчетливую тенденцию к торможению роста стафилококков, снижая количество образующихся колоний в 1,8 раза ($p>0,05$). Степень бактериостатического эффекта заметно зависела от используемой дозы фотовоздействия. Так, доза облучения 60 Дж/см^2 вызывала уменьшение числа колоний в 2,2 раза ($p<0,05$), доза лазерного воздействия 90 Дж/см^2 — в 2,5 раза ($p<0,05$), доза 180 Дж/см^2 уменьшала рост колоний в 3,0 раза ($p<0,02$). При этом максимальная ингибиция роста стафилококков составила 67%.

Таблица

Влияние лазерного излучения (λ – 660 нм) на рост метициллин-чувствительного (MSSA) и метициллин-резистентного (MRSA) штаммов *Staphylococcus aureus* (число колоний)

Серия опытов	Без облучения	Доза облучения, Дж/см^2			
		30	60	90	180
Контроль (MSSA)	373,6±46,2				
Лазер + MSSA		343,2±45,8 p>0,5	317,0±42,2 p>0,2	275,8±31,5 p>0,1	238,8±21,8 p<0,02
Контроль (MRSA)	320,6±69,9				
Лазер + MRSA		176,4±25,3 p>0,05	143,2±19,6 p<0,05	126,4±16,8 p<0,05	107,2±14,8 p<0,02

Примечание: p – достоверность разницы с соответствующим контролем.

Заключение. Низкоинтенсивное лазерное излучение красной области спектра (λ — 660 нм) при плотности мощности 100 мВт/см^2 оказывает ингибирующее влияние на рост колоний метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного штаммов золотистого стафилококка.

Метициллин-резистентный штамм золотистого стафилококка обладает более высокой чувствительностью к действию красного света, поскольку бактериостатический эффект выявляется при действии низких доз облучения.

Таким образом, лазерное излучение красного диапазона спектра оказывает прямое бактериостатическое действие на штаммы золотистого стафилококка.

Литература

1. Residential proximity to large numbers of swine in feeding operations is associated with increased risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at time of hospital admission in rural Iowa veterans / Carrel M., Schweizer M. L., Sarrazin M. V., Smith T. C., Perencevich E. N. // Infect. Control Hosp. Epidemiol.— 2014.— Vol. 35, № 2.— P. 190–193.
2. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public day-care centers in informal settlements in a large urban center in Brazil / Braga E. D., Aguiar-Alves F., de Freitas Mde F, de e Silva M. O., Correa T. V., Snyder R. E., Araújo V. A., Marlow M. A., Riley L. V., Setúbal S., Silva L. E., Cardoso C. A. // BMC Infect. Dis.— 2014.— Vol. 6, № 14.— P. 538–548.
3. *Dissemond J., Goos M., Esser S.* Pathogenetic significance of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in chronic wounds // Vasa.— 2003.— Vol. 32, № 3.— P. 131–138.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ LBP НА АКТИВАЦИЮ КЛЕТОК КРОВИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМИ РАЗНОЙ СТРУКТУРЫ

Я. В. Радзюкевич, Д. А. Серов, И. Р. Прохоренко

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Россия

sibiryak93@mail.ru

Введение. Избыточный ответ организма на бактерии или их продукты, такие как липополисахариды (ЛПС, эндотоксин), лежит в основе многих распространенных воспалительных заболеваний. Как у всех млекопитающих, у людей в крови имеются ЛПС-опознающие белковые системы, центральным элементом которых является ЛПС-связывающий белок (LBP) [1]. Основная функция LBP — транспорт эндотоксинов к эффекторным клеткам (моноцитам, нейтрофилам и др.) и к липопротеинам крови для снижения иммунного ответа. В норме содержание LBP в сыворотке крови колеблется от 5 до 15 мкг/мл, тогда как при заражении грамотрицательными бактериями его концентрация увеличивается в 30–50 раз. Это позволяет использовать данный белок как маркер развития воспалительного процесса в организме. Ответ организма на ЛПС опосредуется высвобождением в кровь цитокинов, среди которых основную роль играет TNF-α. Максимальный синтез этого цитокина приходится на 6-ой час после действия эндотоксинов. При массовом попадании ЛПС в кровь контроль организма над синтезом цитокинов теряется, что приводит к развитию системного воспаления — грам(-)сепсиса. Основным рецептором клеток, опосредующим действие ЛПС, считается TLR4 [2]. Для снижения интенсивности ответа клеток на ЛПС применяются антагонисты эндотоксинов, одним из которых является нетоксичный ЛПС из *Rhodobacter capsulatus* PG. Предварительная инкубация клеток крови с антагонистом снижает уровень цитокинов в крови. Защитный эффект от действия антагониста может быть у разных доноров различным; уровень наработки цитокинов в ответ на действие бактериальных агонистов у разных людей также отличается.

Цель исследования: изучить влияние уровня содержания LBP в крови условно-здоровых доноров на количество нарабатываемого TNF-α в ответ на токсичный ЛПС *Escherichia coli* или нетоксичный ЛПС *R. capsulatus* и на его защитный эффект.

Материалы и методы исследования. В работе использовали липополисахариды из бактерий *E. coli* O55:B5 (Sigma) и *Rhodobacter capsulatus* PG. Нетоксичный ЛПС из R. capsulatus получали методом водно-фенольной экстракции [3]. Чистота препарата подтверждалась с помощью методов количественного определения кетодезоксиоктоновой кислоты [4] и SDS-электрофореза в полиакриламидном геле [5].

Эксперименты проводили на цельной крови 10-ти условно-здоровых доноров 22–24 лет. Для оценки провоспалительного ответа образцы крови инкубировали с токсичными ЛПС из *E. coli*. в течение 6 ч. При исследовании защитного эффекта образцы инкубировали сначала 30 минут с антагонистом, а затем 6 ч с токсичным ЛПС. Концентрацию LBP и TNF-α в образцах оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов «LBP (Human) ELISA Kit» (Abnova, Taiwan) и «ИФА-TNF-alpha» (ООО «Цитокин», Россия).

Защитный эффект выражали в процентах подавления секреции TNF-α в пробах в присутствии антагониста эндотоксина по сравнению с пробами, содержащими только токсичный ЛПС. Результаты экспериментов представлены в виде средних арифметических со стандартными ошибками. Достоверность различия выборочных средних определялась с помощью критерия Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение. Концентрация LBP у исследуемых доноров составила 23,5±2,2 мкг/мл. Разброс в значениях — от 14 мкг/мл до 37 мкг/мл. В норме содержание LBP в крови колеблется от 5 до 15 мкг/мл [1]. С учётом того, что при заболевании количество этого острофазного белка увеличивается в 30–50 раз, мы считаем данные концентрации LBP соответствующими норме. Поскольку концентрация LBP в крови условно-здоровых доноров не зависит ни от возраста, ни от пола [6], полученные данные демонстрируют роль именно LBP в ответе клеток на исследуемые ЛПС.

Концентрация TNF-α в контрольных образцах большинства доноров (n=9) составила 0,8±0,5 пкг/мл, что соответствует норме согласно национальным рекомендациям по лабораторной диагностике ревматических заболеваний.

LBP является одним из основных транспортных белков крови, обеспечивающих доставку липополисахаридов к эффекторным клеткам, в связи с чем можно было предположить, что его количество может влиять на эффективность транспорта и регулировать как ответ клеток крови на эндотоксины, так и эффективность защиты клеток крови антагонистом токсичных ЛПС.

Инкубация клеток крови с нетоксичным ЛПС *R. capsulatus* в конечной концентрации 1000 нг/мл не вызывала наработку TNF-α. Исследуемые нами липополисахариды отличаются по заряду и гидрофобности, однако связываются они с одним и тем же рецепторным комплексом на поверхности эффекторных клеток и транспортируются одними и теми же белками крови. Предполагалось, что концентрация LBP может влиять на эффективность ответа клеток на ЛПС. Полученные результаты не обнаруживают зависимости между исходной концентрацией белка в крови и ответом клеток на нетоксичный ЛПС.

В качестве токсичного ЛПС мы исследовали эндотоксин из *E. coli*. Концентрация TNF-α в крови в ответ на воздействие токсичного ЛПС варьировала у разных доноров от 200 до 3015 пкг/мл, в среднем составив 986±277 пкг/мл. Из полученных данных следует, что интенсивность ответа клеток крови на токсичный ЛПС не связана с концентрацией LBP в крови.

Эффективность защиты клеток крови оценивалась по снижению секреции TNF-α в ответ на добавление токсичного ЛПС после предварительной инкубации крови с нетоксичным ЛПС из *R. capsulatus*. Предобработка крови этим антагонистом снижала продукцию TNF-α клетками крови. Эффективность защиты от ЛПС *E. coli*. в среднем составляла 90,6±3,5%. Таким образом, нетоксичный ЛПС *R. capsulatus* заметно уменьшал ответ клеток крови на эндотоксины. Однако полученные данные не позволяют сделать заключение о существовании зависимости между исходной концентрацией LBP в крови и уровнем ответа клеток крови на ЛПС разной структуры и защитный эффект.

Заключение. LBP взаимодействует с токсичными и нетоксичными структурами ЛПС, обеспечивая их доставку к клеткам крови и внутриклеточную передачу сигнала. Независимо от исходной концентрации, этот белок не влияет на ответы клеток на ЛПС, различающихся по заряду и гидрофобности. Эффективность защиты клеток крови ЛПС *R. capsulatus* от токсичного ЛПС *E. col*.i не зависит от концентрации LBP в диапазоне от 14 до 37 мкг/мл.

Литература

1. *Ding P-H., Jin L.* The role of lipopolysaccharide-binding protein in innate immunity: a revisit and its relevance to oral/periodontal health // J Periodont Res.— 2014.— Vol. 49.— P. 1–9.
2. Молекулярные механизмы взаимодействия эндотоксинов с клетками-мишенями / Грачев С. В., Прохоренко И. Р., Зубова С. В., Кабанов Д. С., Косякова Н. И., Прохоренко С. В., Мельцер М.— М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2012.— 256 с: ил.
3. *Махнева З. К., Вишневецкая Т. А., Прохоренко И. Р.* Влияние метода выделения на выход и состав липополисахаридов из фотосинтезирующих бактерий // Прикл. биохимия и микробиология.— 1996.— Т. 32, № 4.— С. 444–447.
4. *Karkhanis Y. D., Zeltner J. Y., Jackson J. J., Carlo D. J.* A new and improved microassay to determine 2-Keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria // Anal. Biochem.— 1978.— Vol. 85.— P. 595–601.
5. *Krauss J. H., Weckesser J., Mayer H.* Electrophoretic analysis of lipopolysaccharides of purple nonsulfur bacteria // Int. J. Syst. Bacteriol.— 1988.— Vol. 38.— P. 157–163.
6. Determinants of Serum Concentrations of Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) in the Adult Population: The Role of Obesity / Gonzalez-Quintela A., Alonso M., Campos J., Vizcaino L., Loidi L., Gude F.// PLOS ONE.— Vol. 8., № 1 — e54600.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ *LACTOBACILLUS SPP.* ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Г. В. Рябинин

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия

georgij.ryabinin@mail.ru

Введение. Лактобациллы (род *Lactobacillus*) относятся к молочнокислым бактериям, которые являются представителями нормальной микробиоты. Лактобациллы выполняют ряд важных функций, таких как участие в обменных процессах и защите от внешних инфекций. Защитной функцией лактобацилл является прямой и опосредованный антагонизм по отношению к патогенным и условно-патогенным микробам [1]. Известно, что лактобациллы в процессе своей жизнедеятельности синтезируют ряд органических веществ, среди которых выделяют группу ингибиторов роста микроорганизмов [2]. Во многом за счет данного свойства многие лактобациллы включают в состав пробиотиков — пищевых продуктов и лекарственных препаратов, содержащих живые бактерии, способные восстанавливать микробиоту [3].

Цель настоящей работы — выбрать из коллекции клинических изолятов штаммы бактерий, обладающих анта-

гонистической активностью, для дальнейшей оценки их пробиотического потенциала.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

— провести отбор штаммов, способных культивироваться в аэробных условиях на стандартных питательных средах и сохраняющих жизнеспрсобность после пересевов;

— определить принадлежность отобранных штаммов к роду *Lactobacillus* при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР);

— провести исследование антагонизма лактобацилл к индикаторным культурам;

— определить штаммы лактобацилл, обладающих способностью ингибировать рост индикаторных культур.

Материалы и методы исследования. В настоящей работе в качестве антагонистов были использованы штаммы лактобацилл из коллекции Отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ». Данные живые бактерии (43 штамма) были выделены из проб, взятых из организма здоровых пациентов. Далее из 43 штаммов были отобраны 36, способных культивироваться в аэробных условиях на стандартных питательных средах для лактобактерий и сохраняющих жизнеспособность после пересевов. Анализ геномов отобранных штаммов, выполненный путем выделения у бактерий ДНК и постановки ПЦР, показал, что только 31 штамм относится к роду *Lactobacillus*. Далее было проведено исследование антагонистического действия данных штаммов лактобацилл по отношению к индикаторным культурам.

В качестве индикаторных культур мы использовали 4 штамма: *Escherichia coli* BL 21, E. coli JM 109, *E. coli* ATCC 10798 и штамм Listeria ivanovii.

Для культивирования микроорганизмов применяли следующие жидкие и плотные питательные среды: THB (Todd-Hewitt Broth, «Difco», США), MPC1, MPC4 («НИЦФ», Россия), MRS («Difco», США). Все бактериальные штаммы инкубировали в аэробных условиях при 37° С.

Исследование антагонистической активности культур *Lactobacillus spp*. проводили по следующей схеме. В чашки Петри на поверхность MRS-агара (толщиной 4 мм) наносили каплями по 5 μl суточной культуры лактобацилл и культивировали в аэробных условиях при 37° С в течение 24 часов. Суточную культуру индикатора разбавляли в 1000 раз расплавленной агаризованной средой (LB для *E. coli* и THB для *L. ivanovii*) и наносили на MRS-агар таким же слоем толщиной 4 мм. После застывания агаризованной среды, содержащей индикаторную культуру, чашки Петри инкубировали в аэробных условиях в течение 24 часов при 37° С. Ингибирующее действие антагонистов устанавливали по наличию зоны задержки роста индикаторной культуры вокруг колоний лактобацилл.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных экспериментов выявлено, что большинство клинических изолятов (23 из 31 штамма *Lactobacillus spp*.) не проявляли антагонистической активности ни к одной из перечисленных выше индикаторных культур. Остальные восемь штаммов лактобацилл (№№ 3, 7, 14, 17, 19, 20, 22, 40) ингибировали рост только *L. ivanovii*, но не проявили антагонистическую активность в отношении *E. coli*. Зоны задержки роста индикаторной культуры *L. ivanovii* изменялись в пределах от 4 мм до 14 мм.

Заключение. В коллекции штаммов лактобацилл, изолированных из желудочно-кишечного тракта здоровых людей, выявлены 8 штаммов, которые обладают способностью ингибировать рост грамм-положительных индикаторных культур, в частности *L. ivanovii*.

В дальнейших исследованиях планируется изучить природу веществ, определивших антагонизм лактобацилл к индикаторным культурам.

Литература

1. *Шендеров Б. А.* Медицинская и микробная экология и функциональное питание: В 3 т. Т. III: Пробиотики и функциональное питание. М.: ГРАНТЪ, 2001.— 288 с.
2. *Ермоленко Е. И.* Молочнокислые бактерии: индивидуальные особенности действия на патогенные микроорганизмы, макроорганизм и его микробиоту: Автореф. дис. … докт. мед. наук.— СПб., 2009.— 42 с.
3. *Суворов А. Н.* Мир микробов и человек // Природа — 2015.— Т. 5 — С. 11–19.

СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА В СРЕДЕ И СИСТЕМЫ *QUORUM SENSING* НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ *SERRATIA PROTEAMACULANS*

О. А. Цаплина
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

olga566@mail.ru

Введение. Бактерии рода *Serratia* являются факультативными патогенами, которые могут вызывать больничные инфекции. Эти бактерии устойчивы к стандартным методам дезинфекции и многим антибиотикам, что осложняет поиск способов борьбы с этими бактериями. Ранее мы показали, что бактерии *S. proteamaculans* способны к инвазии в клетки эукариот [1]. Одним из факторов, определяющих интенсивность проникновения бактерий *S. proteamaculans*, является порообразующий токсин ShlA [2], активность которого регулируется концентрацией ионов железа в среде. Показано, что

в условиях недостатка железа в среде может происходить не только активация порообразующих токсинов патогенных бактерий, но и индукция экспрессии других факторов вирулентности [3, 4]. Железо в ростовой среде может быть как независимым регулятором факторов вирулентности, так и работать в тесном контакте с системой Quorum Sensing (QS) [5, 6], регулирующей многие вирулентные факторы бактерий в ответ на изменение плотности популяции. Поэтому использование QS-регуляции считается перспективным в качестве потенциальной мишени для борьбы с инфекционными заболеваниями. Предполагается, что при подавлении QS-систем патогенные бактерии будут становиться непатогенными без применения антибиотиков и других лекарственных средств. Показано, что подавление системы QS может уменьшать степень патогенности бактерий для животных.

Цель данной работы состояла в изучении совместного влияния концентрации ионов железа и QS-системы на порообразующий токсин и способность бактерий *S. proteamaculans* проникать в культивируемые клетки человека.

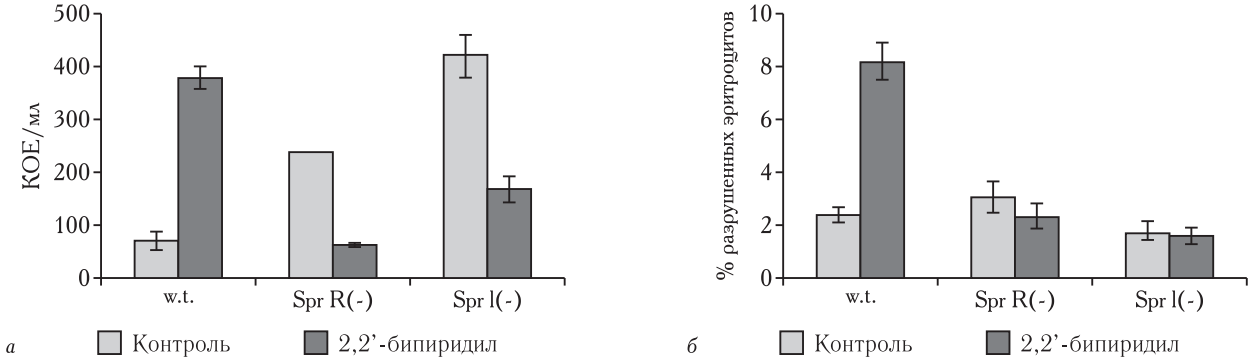


Рисунок. Влияние инактивации генов SprR и SprI в среде, обедненной железом, на инвазивную активность и синтез токсина ShlA. Бактерии растили в среде LB и среде LB с добавлением 0,3 мМ 2,2'-бипиридила. С помощью микробиологического метода определяли интенсивность инвазии (*а*) и с помощью гемолитического теста на эритроцитах определяли активность порообразующего токсина ShlA (*б*).

Материалы и методы исследования. *Инактивация генов.* Для инактивации системы QS в гены SprI и SprR были вставлены кассеты с геном резистентности к гентамицину (штаммы любезно предоставлены сотрудниками лаборатории И. А. Хмель, ИМГ РАН)

Микробиологический метод. Одинаковое количество бактерий, определенное по оптической плотности, осаждали на поверхность клеток карциномы шейки матки человека HeLaM 5 мин со скоростью 2000 об/мин при 18° С. После 2,5 ч инкубации внеклеточные бактерии убивали инкубацией клеток в среде с канамицином (100 мкг/мл, 1 ч). Клетки разрушали 1,5%-м раствором дезоксихолата натрия, проводили высев на 1,5%-й LB-агар и определяли эффективность инвазии, подсчитывая количество колониеобразующих элементов.

Гемолитический тест. Одинаковое количество бактерий инкубировали с 2% эритроцитами морской свинки 1 ч при температуре 37° С. Об активности гемолизина судили по изменению окраски раствора при высвобождении гемоглобина в результате разрушения эритроцитов.

Результаты и их обсуждение. Бактерии *S. proteamaculans* обладают системой QS Lux-типа, которая состоит из двух белков LuxI и LuxR. В S. proteamaculans гомологом LuxI является синтаза SprI, катализирущая реакцию получения сигнальной молекулы N-ацил-гомосеринлактон (АГЛ). При высокой концентрации АГЛ в среде он связываются с бактериальным фактором SprR, гомологичным LuxR, позволяя регулировать транскрипцию генов мишеней.

По данным микробиологического теста в результате инактивации генов SprR и SprI системы QS происходит увеличение инвазивной активности бактерий в 2–3 раза (рис. *а*). При этом результаты гемолитического теста показали, что инактивация генов SprR и SprI практически не влияет на активность порообразующего токсина (рис. *б*). Известно, что синтез порообразующего токсина ShlA активируется при уменьшении концентрации железа в среде. Уменьшение количества железа в среде добавлением 2,2'-бипиридила приводит к увеличению гемолитической активности в 5 раз и инвазивной активности бактерий дикого штамма S. proteamaculans в 2 раза [2]. Рост в обедненной железом среде мутантных бактерий S. proteamaculans, в которых гены SprR и SprI системы QS инактивированны, не влияет на активность токсина ShlA (рис. *б*) и вместо увеличения приводит к уменьшению инвазивной активности в 3 раза (рис. *а*).

Заключение. В отсутствие чувствительности бактерий к плотности популяции при уменьшении концентрации железа не происходит активация порообразующего токсина, а к уменьшению инвазивной активности бактерий приводит изменение активности других факторов вирулентности.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00316 и стипендией Президента Российской Федерации.

Литература

1. Выявление актиназной активности протеализина / Цаплина О. А., Ефремова Т. Н., Кевер Л. В., Комиссарчик Я. Ю., Демидюк И. В., Костров С. В., Хайтлина С. Ю. // Биохимия.— 2009.— Т. 74, № 6.— 797–804 с.
2. *Tsaplina O., Bozhokina E., Mardanova A., Khaitlina S.* Virulence factors contributing to invasive activities of Serratia grimesii and Serratia proteamaculans // Arch Microbiol.— 2015.— Vol. 197 (3).— P. 481–488.
3. Effect of iron concentration on the growth rate of Pseudomonas syringae and the expression of virulence factors in hrp-inducing min-

imal medium / Kim B. J., Park J. H., Park T. H., Bronstein P. A., Schneider D. J., Cartinhour S. W., Shuler M. L. // Appl Environ Microbiol.— 2009.— Vol. 75 (9).— P. 2720–2726.
4. Expression of virulence factors by Staphylococcus aureus grown in serum / Oogai Y., Matsuo M., Hashimoto M., Kato F., Sugai M., Komatsuzawa H. // Appl Environ Microbiol.— 2011.— Vol. 77 (22).— P. 8097–8105.
5. *Fong K. P., Gao L., Demuth D. R.* LuxS and arcB control aerobic growth of Actinobacillus actinomycetemcomitans under iron limitation // Infect Immun.— 2003.— Vol. 71 (1).— P. 298–308.
6. Iron and quorum sensing coordinately regulate the expression of vulnibactin biosynthesis in Vibrio vulnificus / Wen Y., Kim I. H., Son J. S., Lee B. H., Kim K. S. // J Biol Chem.— 2012.— Vol. 287 (32).— P. 26727–26739.

ЧАСТОТА РАСПРОСТРАНЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ СРЕДИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ СЕПСИСОМ

Е. А. Четвернина, О. С. Абрамовских, А. Ю. Савочкина, Л. Р. Торопова, И. В. Молчанова
Южно-Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия
clinlab_chelgma@mail.ru

Введение. Тяжелый сепсис и септический шок — самые частые причины смерти у больных в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), несмотря на использование современных антибактериальных препаратов и технологий интенсивной терапии [1]. Среди всех причин смерти населения сепсис занимает 10 место [2]. В течение последнего десятилетия наблюдается стойкое увеличение заболеваемости сепсисом на 8–13% в год [1].

Известно, что в большинстве случаев тяжелые инфекции (сепсис, пневмония), вызванные антибиотикорезистентными штаммами бактерий, сопровождаются более высокой частотой летальных исходов. В связи с чем, изучение структуры и динамики антибиотикорезистентности микроорганизмов, выделенных из клинического материала больных данной категории, является актуальным [3].

Целью данной работы является оценка частоты распространения антибиотикорезистентных штаммов среди микроорганизмов, выделенных от больных сепсисом.

Материалы и методы исследования. Проведен анализ результатов микробиологического исследования крови 90 пациентов с сепсисом, пролеченных в ОРИТ ГБУЗ «ЧОКБ». Забор крови проводился на 1–10 сутки (в зависимости от исхода заболевания), в результате было получено 616 проб. Диагностика клинического материала осуществлялась в лаборатории клинической микробиологии ГБУЗ «ЧОКБ» с использованием автоматизированной системы BacT/ALERT3D60 (BioMerieux, Франция). Для посева крови использовались стандартные коммерческие флаконы с готовой питательной средой. Идентификация выделенных микроорганизмов проводилась с помощью рутинных микробиологических методов и анализатора VITEK® 2 Compact (BioMerieux, Франция).

Определение чувствительности выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам проводилось с помощью анализатора VITEK® 2 Compact. Для грамотрицательных микроорганизмов использовались карты, содержащие от 18 до 20 антибиотиков, а для грамположительных — карты, содержащие от 19 до 22 антибиотиков. Определение чувствительности к тайгециклину проводилось диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтон. Для определения чувствительности дрожжеподобных грибов применялись карты, содержащие 4 противогрибковых препарата. Чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам определяли на основании пограничных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК), установленных Институтом клинических лабораторных стандартов (CLSI, 2013 г.).

Результаты и их обсуждение. Анализ результатов микробиологического исследования крови пациентов с сепсисом показал, что из 616 проб крови микроорганизмы были выделены в 162 пробах. Таким образом, высеваемость составила 22,4%. У 25 пациентов возбудитель из крови выделен не был. Все изоляты были идентифицированы до вида и проверены на чувствительность к антибактериальным препаратам. Среди стафилококков, выделенных от больных сепсисом, наибольшей устойчивостью к метициллину обладают коагулазонегативные стафилококки (CoNS). Всего 30% изолятов *Staphylococcus aureus* являются метициллинрезистентными (MRSA).

Результаты определения чувствительности изолятов *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* показали, что большинство из них являются полирезистентными к антибактериальным препаратам. При этом *Acinetobacter baumannii* является наиболее «проблемным» возбудителем сепсиса с точки зрения выбора антибактериальной терапии. Среди представителей семейства *Enterobactericeae* наибольшее количество штаммов продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) выявлено у *Klebsiella pneumonia* (57,2%), которая высевалась чаще всего. У *Escherichia coli*, занимающей второе место по частоте выделения, количество БЛРС продуцирующих штаммов немного меньше и составляет 33%.

Из 13 изолятов энтерококков, выделенных из крови пациентов с сепсисом, 3 изолята *Enterococcus faecium* характеризовались устойчивостью к ванкомицину (VRE).

Заключение. Сепсис характеризуется резистентностью и полирезистентностью возбудителей к антибактериальным препаратам, что ограничивает их выбор для лечения пациентов данной категории. Несмотря на то, что в мире существует проблема появления резистентных к карбапенемам энтеробактерий, в ходе данного исследования карбапенем-резистентных штаммов энтеробактерий не выявлено.

Литература

1. Global sepsis alliance. URL: http//www.globalsepsisalliance.com
2. *Kochanek K. D., Smith B. L.* National Vital Statistics Report. Deaths: Preliminary Data for 2002 // Centers for Disease Control and Prevention.— 2004.— Vol. 52, № 3-1-32. 2-11-2004.
3. *Atef M. Shibl, Ziad A.* Memish Пути решения проблемы антибиотикорезистентности в стационаре. URL: http://www.antibiotic.ru/books/gich/8.shtml

Наши подписные индексы:
Агентство «Роспечать» — **57999**
Объединенный каталог «Пресса России» — **42190**

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

ФАКТОРЫ РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ 1 И 2 ТИПА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ КОСТЕЙ

А. А. Алфёров, Е. А. Тен, С. С. Бабкин, А. И. Батырев
Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина, Минздрава России, Москва, Россия
aleksander.alferov@yahoo.com

Экспериментально доказано, что факторы роста фибробластов (*FGF*) участвуют в дифференцировке клеток. Добавление *FGF-2* к линии клеток остеосаркомы крыс *ROS17/2.8* дозозависимо подавляет экспрессию регуляторов дифференцировки остеобластов *Core-binding factor alpha 1* (*Cbfa1*), связанных с формированием фенотипа остеобластов [1]. В неминерализующих клетках остеосаркомы человека MG 63 отметили гиперэкспрессию *FGF-2* и его рецепторов, а в клетках минерализующей линии TE 85, под действием *FGF-2* показано снижение экспрессии проколлагена и остеокальцина [2]. *FGF-1* и *FGF-2* также относятся к проангиогенным факторам [3]. Доказано, что уровни *VEGF* и *FGF-2* в сыворотке крови больных остеосаркомой кости выше, чем у здоровых людей ($\rho<0,01$), позитивно коррелируют с размером первичной опухоли и степенью ее дифференцировки, а также могут быть факторами прогноза при остеосаркоме [4, 5].

Цель настоящего исследования — анализ содержания *FGF-I* и *FGF-II* в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей и их взаимосвязи с гистологическим строением опухоли и прогнозом заболевания.

Материалы и методы. Обследовали 105 пациентов с саркомами костей: типичная остеосаркома (32), паростальная остеосаркома (5), периостальная остеосаркома (1), хондросаркома (32), саркома Юинга (26), недифференцированная плеоморфная саркома (9) в возрасте от 15 до 69 лет. Группу контроля составили 26 людей в возрасте от 16 до 65 лет. Сывороточные уровни *FGF-1* и *FGF-2* определяли ИФА реактивами фирмы «R&D» (США). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью непараметрических методов, в качестве центральной характеристики маркеров использовали медиану.

Результаты исследования. Показатели *FGF-1* в сыворотке крови больных саркомами костей были в диапазоне от 0 до 590 пг/мл (медиана 39,4 пг/мл); в образцах контрольной группы — от 0 до 98,4 пг/мл (19 пг/мл). Верхняя граница референсного 95% ДИ у практически здоровых людей составила 86,3 пг/мл. За нулевые значения принято содержание *FGF-1* менее 13,9 пг/мл, в соответствии с рекомендациями производителя наборов реактивов. Чаще уровни *FGF-1*, отличные от ноля, выявляли в сыворотке крови у больных саркомами костей (65,7%), чем в контроле (26,9%, $\rho<0,001$). Концентрации *FGF-2* у больных саркомами костей колебались от 4,4 до 206 пг/мл (16,3 пг/мл), а в группе контроля — 4,9–62,8 пг/мл (11,9 пг/мл). Не обнаружили достоверной корреляционной связи между уровнями *FGF-1* и *FGF-2* в крови здоровых ($r=-0,57$; $p=0,18$) и больных саркомами костей ($r=0,04$; $p=0,7$). Не выявили взаимосвязи между уровнями *FGF-1* и *FGF-2* и стадией заболевания, размером опухоли и степенью выраженности ее лечебного патоморфоза.

Под наблюдением в течение от 1 года до 5 лет было 93 пациента. Общая 5-летняя выживаемость в наибольших по численности группах больных типичной остеосаркомой и хондросаркомой была практически одинаковой (56,9% и 56% соответственно), в группе больных саркомой Юинга — 47,5%. При типичной остеосаркоме общая 5-летняя выживаемость при нулевом содержании *FGF-1* в сыворотке крови равнялась 83,3%, при значимых уровнях маркера она была в 1,7 раза ниже (49,7%, $\rho=0,019$). Взаимосвязи между уровнями *FGF-2* в сыворотке крови и общей выживаемостью у больных типичной остеосаркомой не выявили. При саркоме Юинга общая 5-летняя выживаемость больных не зависела от уровня *FGF-1* в сыворотке крови. Максимальные показатели общей 5-летней выживаемости у больных саркомой Юинга отметили при содержании *FGF-2* в сыворотке крови менее 10 пг/мл (80%), минимальные — 20,8% при уровнях *FGF-2* более 27 пг/мл ($\rho=0,032$). Медиана выживаемости у больных саркомой Юинга с высоким значением любого из пары маркеров *FGF-1* >20 пг/мл, *FGF-2* >16 пг/мл составила 19,3 месяцев, а общая 5-летняя выживаемость 27,3±15,2%. Не установлено связи между содержанием сывороточных *FGF-1* и *FGF-2* у больных хондросаркомой и отдаленными результатами лечения.

Заключение. В проведенном исследования показано, что уровни *FGF-1* выявлены в сыворотке крови у 65,7% больных саркомами костей и у 26,9% практически здоровых людей ($\rho<0,0001$). Показано, что при наличии значимых уровней *FGF-1* в сыворотке крови больных типичной остеосаркомой общая 5-летняя выживаемость была 1,7 раза ниже, чем при его отсутствии ($\rho=0,01$). Значения *FGF-1* >20 пг/мл, *FGF-2* >16 пг/мл в сыворотке крови больных саркомой Юинга сочетались с низкими показателями их общей выживаемости. При хондросаркоме взаимосвязи между содержанием *FGF-1* и *FGF-2* в сыворотке крови больных и общей выживаемостью, не установлено.

Литература

1. *Tsuji K., Noda M.* Transient suppression of core-binding factor alpha 1 expression by basic fibroblast growth factor in rat osteoblast-like osteosarcoma ROS17/2.8 cells // J. Bone Miner. Metab.— 2001.— Vol. 19, № 4.— P. 213–219.

2. Basic fibroblast growth factor autocrine loop controls human osteosarcoma phenotyping and differentiation / Bodo M., Lilli C., Bellucci C., Carinci P., Calvitti M., Pezzetti F., Stabellini G., Bellocchio S., Balducci C., Carinci F., Baroni T. // Mol. Med.— 2002.— Vol. 8, № 7.— P. 393–404.
3. *Powers C. J., McLeskey S. W., Wellstein A.* Fibroblast growth factors, their receptors and signaling // Endocr. Relat. Cancer.— 2000.— Vol. 7, № 3.— P. 165–197.
4. The correlation between the level of serum VEGF and bFGF with metastasis and prognosis of osteosarcoma / Chen G. L., Lin H. B., Wu X. W., Li R. Y., Chen X. H. // Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.— 2011.— Vol. 27, № 12.— P. 1343–1345.
5. Clinical predictive value of serum angiogenic factor in patients with osteosarcoma / Chen Z., Chen Q. X., Hou Z. Y., Hu J., Cao Y. G. // Asian Pac. J. Cancer. Prev.— 2012.— Vol. 13, № 9.— P. 4823–4826.

ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ ЛИПИДНОГО СПЕКТРА КРОВИ ПРИ ПСОРИАЗЕ И ПСОРИАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ

А. А. Барило, С. В. Смирнова, М. В. Смольникова
Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия
anntomsk@yandex.ru

Введение. Псориаз (ПС) и псориатический артрит (ПсА) — системные заболевания мультифакториальной природы, характеризующиеся гиперпролиферацией эпидермоцитов и нарушением их дифференцировки, иммунопатологическими реакциями в дерме и синовиальных оболочках, часто сопровождающиеся патологическими изменениями опорно-двигательного аппарата [1]. Широкая распространенность псориаза, хроническое рецидивирующее течение заболевания с частыми обострениями, приводящее к временной утрате трудоспособности и инвалидизации, отсутствие эффективных методов лечения позволяют рассматривать ПС и ПсА как важную медико-социальную проблему, что обуславливает актуальность их изучения [2]. В патогенезе ПС и ПсА важная роль отводится нарушениям липидного обмена на фоне заболеваний гепатобилиарной системы, способствующим развитию атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [3, 4]. Изучение особенностей нарушений липидного спектра крови в зависимости от степени тяжести ПС и ПсА позволит выявить маркеры прогрессирования патологии.

Цель работы. На основании изучения показателей липидного спектра крови больных псориазом и псориатическим артритом установить маркеры, имеющие прогностическое значение в прогрессировании псориатической болезни.

Материалы и методы исследования. В исследование включены 97 больных распространенным ПС в возрасте от 18 до 66 лет. Выделены группы: больные ПС (n=49), больные ПсА (n=48), контрольная группа — практически здоровые доноры крови (n=35), сопоставимые по полу и возрасту. Степень тяжести псориатического процесса оценивалась по индексу *PASI* (*Psoriasis Area and Severity Index*) с использованием стандартизированной балльной системы оценки основных клинических симптомов. Больные ПС и ПсА разделены на группы в зависимости от степени тяжести кожного процесса: легкая — индекс *PASI*<10,0 баллов и среднетяжелая — индекс *PASI*⩾10,0 баллов. Исследование липидного спектра крови включало определение концентраций общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой (ЛПВП) и низкой плотности (ЛПНП), триглицеридов (ТГ) с помощью стандартного набора реактивов фирмы «BPC+BioSed» (Италия). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием прикладной программы «Statistica 6.0». Полученные результаты представлены в виде: Me (25%; 75%). Для всех видов статистического анализа различия считались статистически достоверными при достигнутом уровне значимости $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных нами исследований выявлено, что у больных ПсА независимо от степени тяжести заболевания отмечено статистически значимое повышение уровня общего холестерина и липопротеидов низкой плотности в сыворотке крови в сравнении с ПС и группой контроля (таблица). Дислипидемия, которая характеризуется повышением общего холестерина и изменением соотношения липопротеидов в пользу преобладания холестерина (ЛПНП) отражает высокую активность изменений липидного обмена при ПсА, что согласуется с данными литературы о том, что данный фактор риска может является важным предиктором артропатического псориаза. Гиперхолестеринемия и повышение ЛПНП в сыворотке крови при ПсА, вероятно, обуславливает выработку активированными клетками иммунной системы провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-1 и IFN-γ) в атеросклеротических бляшках, которые способствуют формированию воспалительного процесса в суставах при прогрессировании псориатической болезни [5, 6].

Кроме того, при изучении липидного спектра установлено статистически значимое снижение уровня триглицеридов в сыворотке крови во всех группах больных ПС и ПсА, независимо от степени тяжести заболевания в сравнении с группой контроля. Полученные нами данные противоречат выводам ранее опубликованных исследований, свидетельствующих о повышении уровня триглицеридов в прогрессирующую стадию псориатического процесса [7]. Снижение уровня триглицеридов в периферической крови при псориатическом процессе может быть связано с наличием паренхиматозных повреждений печени у больных ПС и ПсА [3]. При сравнении уровня триглицеридов в сыворотке крови больных ПС и ПсА выявлены статистически значимые межгрупповые различия: снижение уровня триглицеридов

Таблица

Показатели липидного спектра периферической крови в зависимости от степени тяжести псориаза и псориатического артрита, Me [C25;C75]

Показатели	Группы					p
	ПС		ПсА		Контроль (5) (n=35)	
	Легкая (1) (n=10)	Среднетяжелая (2) (n=39)	Легкая (3) (n=7)	Среднетяжелая (4) (n=41)		
Общий холестерин ммоль/л	4,2 [3,9; 5,1]	4,3 [3,7; 5,6]	5,2 [4,6; 7,3]	5,04 [4,3; 5,9]	4,3 [3,9; 5,0]	$p_{1,3}$=0,001 $p_{2,4}$=0,03 $p_{3,5}$=0,002 $p_{4,5}$=0,007
ЛПНП, ммоль/л	2,0 [1,5;2,6]	1,9 [1,6;2,3]	2,7 [1,7;3,8]	2,6 [2,3;3,3]	1,7 [1,5;2,1]	$p_{1,3}$=0,03 $p_{2,4}$=0,002 $p_{3,5}$=0,001 $p_{4,5}$=0,04
ЛПВП, ммоль/л	1,5 [1,2;2,0]	1,6 [1,4;1,7]	1,9 [1,5;1,9]	1,6 [1,3;1,8]	1,5 [1,2; 1,7]	—
ТГ, ммоль/л	0,5 [0,4;0,6]	0,7 [0,6;1,2]	1,05 [0,8;1,4]	1,2 [0,7;1,6]	1,7 [1,5; 1,9]	$p_{1,3}$=0,03 $p_{1,4}$=0,001 $p_{1,5}$=0,005 $p_{2,5}$=0,01 $p_{3,5}$=0,02 $p_{4,5}$<0,001
Индекс атерогенности	2,3 [2,3; 2,3]	1,6 [1,4; 1,7]	1,6 [1,4; 1,7]	2,05 [1,4; 2,6]	2,1 [1,4; 2,5]	—

Примечание: достоверность различий (p) - критерий Манна-Уитни. Значения p указаны только при p?0,05.

в сыворотке крови больных ПС низкой степени тяжести (в 2,1 раза) и средней степени тяжести (в 1,7 раза) в сравнении с группами больных ПсА, соответственно.

Выводы. Независимо от степени тяжести заболевания маркером псориаза является снижение уровня триглицеридов в сыворотке крови, а маркерами псориатического артрита — повышение уровня общего холестерина и ЛПНП в сыворотке крови.

Заключение. Таким образом, нарушения липидного обмена являются значимыми патогенетическими факторами псориаза и псориатического артрита и не зависят от степени тяжести заболевания, но имеют особенности в процессе прогрессирования псориатической болезни.

Литература

1. *Скрипкин Ю. К., Бутова Ю. С., Мордовцев В. Н., Акимов В. Г. и др.* Клиническая дерматовенерология: руководство для врачей: в 2 томах. М., 2009.— Т. 2.— 928 с.
2. *Chandran V., Raychaudhuri S. P.* Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis // J. Autoimmun.— 2010.— Vol. 34.— P. 314–321.
3. *Смирнова С. В., Барило А. А., Смольникова М. В.* Заболевания гепатобилиарной системы как предикторы прогрессирования псориаза // Вестник РАМН.— 2016.— № 2.— С. 102–108.
4. Serum lipid profile in psoriatic patients: correlation between vascular adhesion protein 1 and lipoprotein (a) / Nemati H., Khodarahmi R., Rahmani A., Ebrahimi A., Amani M., Eftekhari K. // Cell Biochem. Funct.— 2013.— Vol. 31. №1.— P. 36–40.
5. *Mok C. C., Ko G. T., Ho L. Y. et al.* Prevalence of atherosclerotic risk factors and the metabolic syndrome in patients with chronic inflammatory arthritis // Arthritis. Care. Res.— 2011.— Vol. 63, № 2.— P. 195–202.
6. *Raychaudhuri S. K., Chatterjee S., Nguyen C. et al.* Increased prevalence of the metabolic syndrome in patients with psoriatic arthritis // Metab. Syndr. Relat. Disord.— 2010.— Vol. 8, № 4.— P. 331–334.
7. *Орлов Е. В., Коннов П. Е., Котельникова Е. В.* Оценка эффективности применения препарата фосфоглив в комплексной терапии больных псориазом // Вестник дерматологии и венерологии.— 2010.— № 4.— С. 69–72.

ГЕНОДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ В 2015 ГОДУ

А. А. Батурин, Г. А. Ткаченко, М. Л. Леденева, Л. В. Лемасова
Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Россия

vari2@sprint-v.com.ru

Вирус Западного Нила (*West Nile virus*, ВЗН) является возбудителем одной из природно-очаговых арбовирусных инфекций с трансмиссивным механизмом передачи, называемой лихорадкой Западного Нила (ЛЗН). С момента первого обнаружения в крови жительницы Уганды в 1937 г. (Smithburn K. C., 1940) ВЗН и его маркеры в дальнейшем выявляли в разных регионах мира. Так, на территории бывшего СССР ВЗН впервые был изолирован из преимаго иксодовых клещей *Hyalomma marginatum*, собранных в Астраханской области (Львов Д. К., 2000). Длительное время ВЗН в России не представлял серьезной угрозы населению. Но с момента первой крупной вспышки ЛЗН, произошедшей в 1999 г., случаи данного заболевания в РФ стали регистрироваться ежегодно. Штаммы ВЗН, выявленные в разное время на территории России, представляли собой генетические линии 1а, 2 и 4 (Платонов А. Е., 2011). Циркуляция ВЗН разных генотипов в регионах РФ делает актуальным проведение генотипирования изолятов данного вируса.

Цель исследования заключалась в обнаружении вируса Западного Нила в образцах биоматериала, собранного в различных регионах РФ в 2015 г., и генотипировании данного вируса методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Материалы и методы. В работе проанализировано 687 образцов клинического и аутопсийного материала, а также объектов внешней среды, поступивших в 2015 году в Референс-центр по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора для исследования на наличие РНК ВЗН. Образцы получены из Астраханской области, Волгоградской области, Ростовской области, Самарской области, Саратовской области, Челябинской области, республики Адыгея, республики Коми, Краснодарского края и Приморского края. Клинические образцы были отобраны от 29 лиц с подозрением на инфицированность ВЗН и включали в себя пробы сывороток крови и цельной крови. Образцы аутопсийного материала представляли собой пробы головного мозга и внутренних органов 4 лиц, умерших в результате менингоэнцефалита. В качестве объектов внешней среды использовали биологический материал от резервуаров (дикие и синантропные птицы) и переносчиков (комары, клещи, мошка) ВЗН. Для исследования было использовано 56 птиц (представлены 17 видами), 19841 особь кровососущих комаров (представлены 9 видами), 74 особи иксодовых клещей (представлены 3 видами) и 470 особей мошки *Titanopteryx maculata*. От птиц для исследования отбирали головной мозг, печень и селезенку. Комаров, клещей и мошку распределяли на пулы по видам. Из органов человека и животных, а также пулов членистоногих готовили суспензии в физиологическом растворе.

Выделение РНК осуществляли из 100 мкл пробы с использованием комплектов реагентов «РИБОзоль-С» и «АмплиПрайм РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкциями к наборам.

Для скрининга на наличие РНК ВЗН использовали набор реагентов «АмплиСенс WNV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Типирование проводили посредством ОТ-ПЦР с использованием двух пар экспериментальных праймеров и двух зондов, сконструированных на основе последовательности гена protC и 5'-нетранслируемой области генома ВЗН, для дифференциации 1а и 2 генетических линий ВЗН. ОТ-ПЦР в реальном времени осуществляли на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

Результаты и их обсуждение. В результате скринингового исследования материала от больных с симптомами ЛЗН РНК ее возбудителя была обнаружена у 7 лиц: у 5 человек из Саратовской области и у 2 человек из Ростовской области. При исследовании аутопсийного материала РНК ВЗН была выявлена в тканях головного мозга и селезенки у одного умершего больного из Астраханской области. Среди обследованных птиц РНК ВЗН была обнаружена в пробах органов от 1 особи большой синицы *Parus major* (отловлена на территории Саратовской области) и 2 особей серебристой чайки *Larus argentatus* (одна из которых была из Саратовской, а другая — Волгоградской областей). Положительным оказался и один пул из 2 клещей *Dermacentor marginatus*, отбор которых был произведен в Самарской области. При исследовании пулов комаров и мошки РНК ВЗН выявлено не было.

Реакции ПЦР-типирования были проведены с тремя положительными образцами, концентрация вирусной РНК в которых была наиболее высокой (значение порогового цикла по результатам скрининговой ОТ-ПЦР составляло не более 30): проба цельной крови от больного ЛЗН из Саратовской области, проба аутопсийного материала от умершего человека из Астраханской области и проба внутренних органов большой синицы *Parus major*, отловленной на территории Саратовской области. В результате генотипирования в пробе от больного из Астраханской области установлен 1а генотип ВЗН, а генотип 2 ВЗН в пробах цельной крови человека и внутренних органов большой синицы. Синтезированные при проведении ПЦР-типирования ампликоны были секвенированы. Последовательность нуклеотидов, полученная в результате секвенирования ВЗН 1а генотипа, является высокогомологичной изолятам ВЗН первого генотипа, циркулировав-

шим на территории Астраханской области в 1999 г. (GenBank: AY278441), а последовательность, полученная для ВЗН второго генотипа — волгоградскому изоляту второго генотипа *RebVLG07H* (GenBank: FJ425721).

Выводы. При проведении генодиагностики ЛЗН в 2015 г. циркуляция ВЗН была выявлена в Астраханской, Волгоградской, Самарской и Саратовской областях. Генотипирование ВЗН показало, что выделенные в 2015 г. изоляты относятся к 1а и 2 генетическим линиям данного вируса. Секвенирование положительных проб ВЗН подтвердило результаты ПЦР-типирования, проведенного с экспериментальными праймерами и зондами, сконструированными для дифференциации 1а и 2 генотипов ВЗН.

СОСТОЯНИЕ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В СЛЮНЕ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО

Л. В. Бельская, В. К. Косенок
ООО «ХимСервис», Москва, Россия

Ludab2005@mail.ru

До настоящего времени остаются актуальными проблемы оптимизации методов диагностики и прогнозирования течения рака легкого (РЛ), занимающего лидирующие позиции в структуре онкологических заболеваний. В последние годы в механизмах канцерогенеза важная роль отводится избыточному образованию активных форм кислорода, обладающих не только выраженным мутагенным действием, но и инициирующих процессы липопероксидации в биологических мембранах.

Целью исследования являлось установление закономерностей изменений процессов липопероксидации в слюне пациентов с РЛ для оптимизации традиционных методов диагностики и прогнозирования течения заболевания.

В исследование включены 445 пациентов Клинического онкологического диспансера г. Омска (29% пациентов женского пола, 71% — мужского) и 535 практически здоровых людей, выбранных в качестве контрольной группы. Средний возраст больных составил 58,5±0,9 года для мужчин, 56,0±2,1 года для женщин и 49,4±4,7 года для контрольной группы. Исследуемая группа включала 337 больных раком легкого с различными гистологическими типами (плоскоклеточный, мелкоклеточный рак, аденокарцинома) и формой роста (центральный и периферический); 108 больных с незлокачественной легочной патологией, из них 7 — хронической пневмонией, 20 — туберкулезом легких, 28 — гамартомой, 10 — саркоидозом, 24 — фиброзом и др. Группы обследуемых были сформированы согласно правилам проведения клинических испытаний после получения информированного согласия. В качестве критериев включения рассматривались: возраст пациентов 30–70 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент проведения исследования, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого, отсутствие признаков активной инфекции (включая гнойные процессы), проведение санации полости рта.

У всех пациентов до начала лечения проводили забор слюны в количестве 1 мл. Во всех образцах определяли концентрацию ацилгидроперекисей по степени светопоглощения при длинах волн 220, 232, 278 и 400 нм, рассчитывали уровень диеновых конъюгатов (ДК) в относительных единицах как 232/220, триеновых конъюгатов (ТК) как 278/220 и оснований Шиффа (ОШ) как 400/220.

В ходе проведенных исследований обнаружены достоверные отличия содержания продуктов липопероксидации. Так, уровень ДК в слюне снижается на 8,5% при переходе от контрольной группы к пациентам с незлокачественной легочной патологией (доброкачественные образования — ДНО) и еще на 8,5% при переходе к пациентам с РЛ (3,89; 3,59 и 3,33 у.е.— средние значения каждой группы соответственно). Причем описанные изменения характерны для всех включенных в исследование возрастных групп (рис. *а*). Недостаточный уровень продуктов липопероксидации может являться результатом устойчивости опухолевой ткани к инициаторам перекисного стресса и модификации функционирования ферментативных систем, регулирующих перекисное окисление липидов. Однако, для ТК и ОШ наблюдается обратная зависимость, в норме уровень данных продуктов существенно ниже, чем при наличии патологий легких, причем отличия между злокачественной и незлокачественной патологиями статистически недостоверны (рис. *б*, *в*). Следует отметить тенденцию к увеличению содержания продуктов липопероксидации с возрастом для всех исследуемых групп, исключение составляет уровень ОШ в группе пациентов с РЛ. ОШ — конечные продукты пероксидации липидов, они представляют собой необратимые «сшивки» диальдегидов со свободными аминогруппами мембранных белков и характеризуют стадию дегенеративных изменений клеток. С другой стороны, высокий уровень ОШ можно рассматривать как адаптивный процесс, направленный на элиминацию из клеток более токсичных метаболитов липопероксидации — ДК и малонового диальдегида.

Интересным является состояние активности процессов липопероксидации в зависимости от стадии заболевания, так содержание ОШ остается на стабильно высоком уровне по сравнению с контрольной группой, как и ТК, однако для последних характерен рост содержания при переходе от локальных стадий заболевания к местно-распространенным (рис. *г*). Для ДК в этом же направлении происходит уменьшение содержания, достигая минимального значения при метастатическом поражении (3,09 у.е.), что свиде-

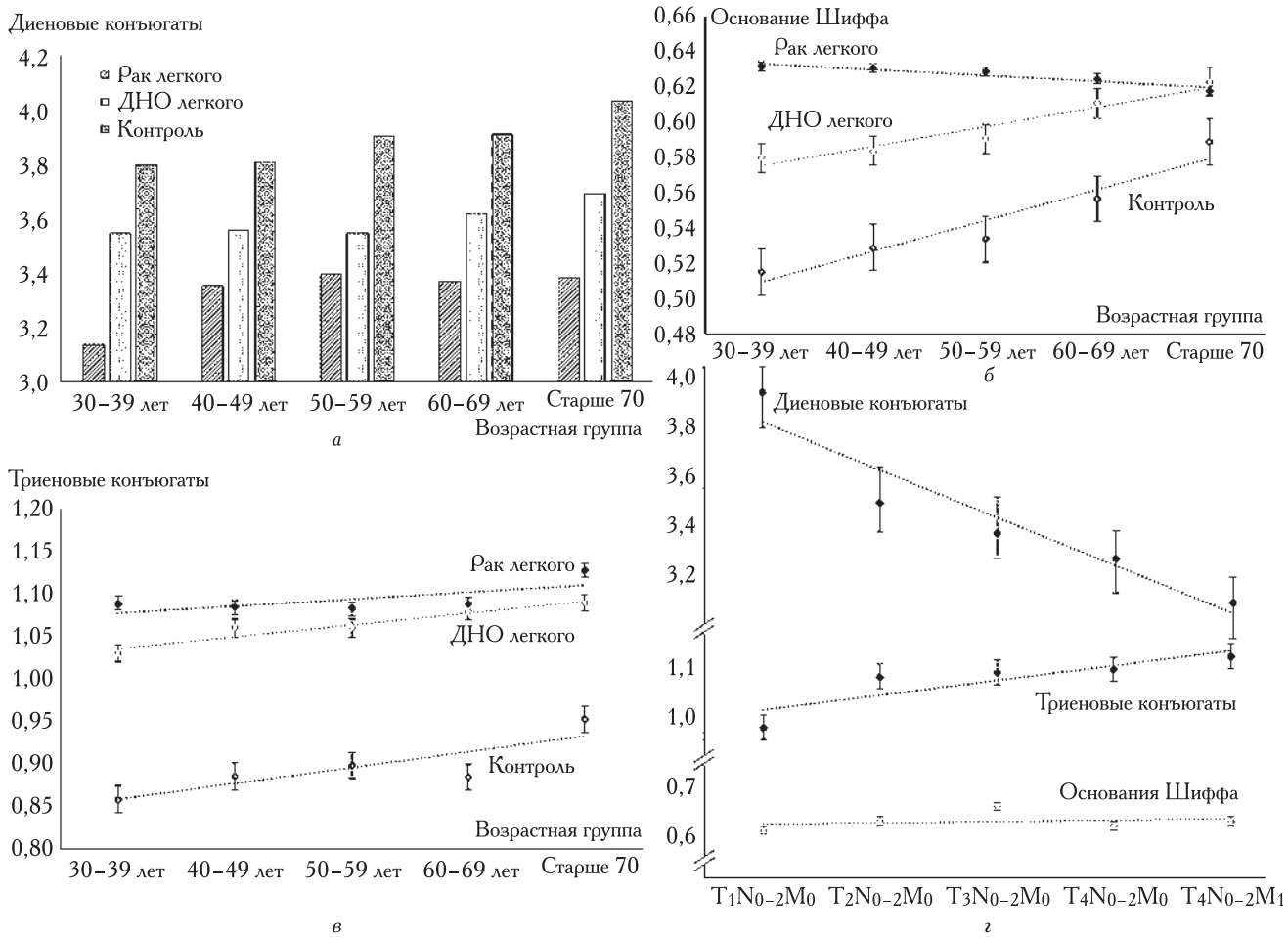


Рисунок. Состояние процессов липопероксидации в слюне пациентов с раком легкого, незлокачественными легочными патологиями (ДНО легкого) и условно здоровых (контроль): уровень диеновых конъюгатов (*а*), триеновых конъюгатов (*б*), оснований Шиффа (*в*), зависимость процессов липопероксидации от стадии заболевания (*г*).

тельствует о максимальном угнетении свободнорадикальных процессов, прогрессирующем по мере роста опухоли.

Таким образом, установлены закономерности процессов липопероксидации в слюне. Полученные результаты могут быть использованы для оптимизации традиционных методов диагностики, прогнозирования течения заболевания и мониторинга процесса лечения и т.д.

УРОВЕНЬ МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ В СЛЮНЕ ПРИ ОНКОПАТОЛОГИИ

Л. В. Бельская, В. К. Косенок
ООО «ХимСервис», Москва, Россия

Ludab2005@mail.ru

Молекулы средней массы (МСМ) — это вещества с молекулярной массой от 1500 до 5000 Да, которые являются универсальными маркерами эндотоксикоза. Природа МСМ неоднородна. Установлено, что большая часть идентифицированных по химическому составу МСМ представляет собой фрагменты эндогенных белков. Нельзя исключить, что первичным продуктом для образования МСМ служат ацилгидроперекиси и фрагменты поврежденных клеточных мембран. Являясь в нормальных условиях естественными биогенными регуляторами, МСМ в повышенных концентрациях обладают широким спектром патологического действия. МСМ ингибируют митохондриальное дыхание, синтез ДНК в альвеолярных макрофагах и лимфоцитах, угнетают синтез гемоглобина, снижают активность лактатдегидрогеназы и т.д.

Основным методом определения МСМ является ультрафиолетовая спектрофотометрия биологических жидкостей. При этом диапазон длин волн 220–255 нм — спектр максимального поглощения неароматических (254 нм) серосодержащих аминокислот (цистина, цистеина, метионина), 250–256 нм — максимум экс-

тинкций для пуриновых оснований (аденин, гуанин). В диапазоне длин волн 238–242 нм регистрируются вещества катаболического происхождения, ксенобиотики, продукты распада клеток, тканей, вещества микробной природы. Диапазон длин волн 238–244 нм — спектр максимального поглощения мочевины, мочевой кислоты, креатинина. Близки к этому максимуму спектры поглощения продуктов деградации альбумина, фибриногена, неэстерифицированных жирных кислот и других веществ. Появление высоких значений экстинкций при длине волн 238, 242, 246 нм всегда свидетельствует о патологических процессах в организме. Длина волны 258 нм — спектр максимального поглощения АДФ, АМФ, аденина, L-валина, L-фенилаланина. А длина волны 280 нм — спектр максимального поглощения света ароматическими хромофорами — фенолами, тирозином, триптофаном, фенилаланином.

мированного согласия. В качестве критериев включения рассматривались: возраст пациентов 30–70 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент проведения исследования, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого, отсутствие признаков активной инфекции (включая гнойные процессы), проведение санации полости рта. У всех пациентов до начала лечения проводили забор слюны в количестве 1 мл, определяли уровень МСМ при длинах волн 254 и 280 нм с последующим расчетом коэффициента распределения (МСМ 280/254 нм).

Показано, что уровень МСМ в слюне увеличивается с возрастом как в норме (рис. *а*), так и на фоне онкологической патологии (рис. *б*), при этом наблюдается рост обеих фракций и ароматического, и неароматического происхождения. Показатель наклона линии тренда в случае контрольной группы (рис. *а*) будет в 1,47–1,49 раза больше, чем для группы пациентов с РЛ (рис. *б*).

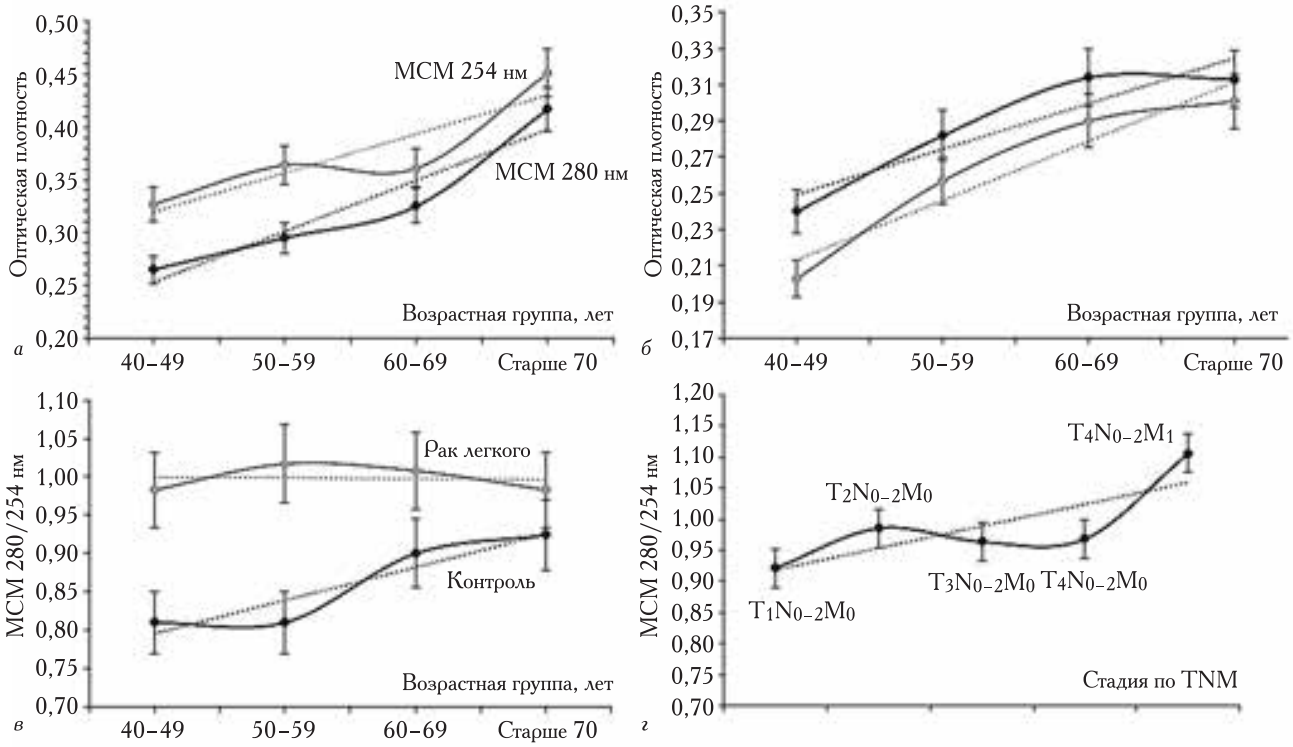


Рисунок. Динамика уровня МСМ в норме и на фоне онкологической патологии.

Целью работы являлось исследование уровня МСМ в слюне пациентов онкологического профиля, в частности больных раком легкого (РЛ).

В исследование включены 337 пациентов Клинического онкологического диспансера г. Омска (29% пациентов женского пола, 71% — мужского) и 535 практически здоровых людей, выбранных в качестве контрольной группы. Средний возраст больных составил 58,5±0,9 года для мужчин, 56,0±2,1 года для женщин и 49,4±4,7 года для контрольной группы. Исследуемая группа включала больных РЛ с различными гистологическими типами (плоскоклеточный, мелкоклеточный рак, аденокарцинома) и формой роста (центральный и периферический). Группы обследуемых были сформированы согласно правилам проведения клинических испытаний после получения инфор-

Расчет коэффициента распределения показывает, в случае контрольной группы нарастание фракции МСМ 280 нм происходит примерно на 30% быстрее, чем фракции 254 нм, что обеспечивает стабильно равномерный рост показателя МСМ 280/254 нм, тогда как среднее значение сохраняется на уровне 0,855±0,030 единиц (рис. *в*).

В группе пациентов с РЛ с возрастом коэффициент распределения практически не меняется и варьирует в диапазоне 0,977±0,028 единиц (рис. *в*). Таким образом, несмотря на то, что динамика изменения отдельных фракций МСМ между группами однотипна, коэффициент распределения статистически достоверно выше для группы пациентов с РЛ. Более активный прирост фракции МСМ 254 нм может свидетельствовать в данном случае о стимуляции процессов перекисного окисления липидов и иммуногенеза.

Дополнительно проведена оценка изменения коэффициента распределения в зависимости от стадии заболевания по системе TNM. Отмечено, что отношение МСМ 280/254 нм остается примерно постоянным до четвертой стадии включительно и равно 0,927±0,024 единицы, однако резко возрастает при наличии метастатического поражения до 1,106±0,017 единиц, что является следствием резкого нарастания явлений эндотоксикоза (рис. г).

Таким образом, коэффициент распределения МСМ 280/254 нм можно использовать в динамике для контроля явлений эндотоксикоза в процессе лечения пациентов онкологического профиля.

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОВ У ДЕТЕЙ

Е. А. Дементьева

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Россия

zorra2@yandex.ru

Введение. Гломерулонефрит является иммуноопосредованным заболеванием с диффузным пролиферативно-экссудативным поражением клубочкового аппарата почек. В основе патогенеза лежит дисбаланс регуляторных механизмов иммуноцитов и клеток почечного клубочка [1]. ANCA-ассоциированный гломерулонефрит (ANCA-ГН) развивается, как правило, на фоне системного васкулита, при котором серологически диагностируются аутоантитела к цитоплазме нейтрофилов [2]. ANCA-антитела после взаимодействия с рецепторным аппаратом нейтрофилов активируют их. Активированные нейтрофилы действуют на стенки капилляров клубочков почек с развитием в них фибриноидного некроза и воспаления [3].

При вирус-ассоциированном гломерулонефрите (ВА-ГН) установлена этиологическая и/или патогенетическая роль вирусной инфекции [4]. Его развитие сопровождается изменениями в иммунной системе. Нарушение дифференцировки лимфоцитов является предрасполагающим фактором персистенции и рецидивирования вирусной инфекции [5]. Дисфункция клеточного звена иммунитета приводит к нарушению элиминации вирус-содержащих иммунных комплексов и отложению их в клубочках почек [4].

Исследование дифференцировки лимфоцитов при развитии различных типов гломерулонефритов позволит определить основные иммунологические механизмы, участвующие в патогенезе данных заболеваний.

Цель исследования: определить изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов у детей с ANCA-ГН и ВА-ГН.

Материалы и методы: 1 группа — 25 детей в возрасте от 1 до 16 лет, с ANCA-ГН. 2 группа — 25 детей в возрасте от 2 до 16 лет с ВА-ГН. Диагностика субпопуляционного состава лимфоцитов — проточная цитометрия (Epics XL-MCL, Beckman Coulter, США) по безотмывочной технологии с использованием трехцветной комбинации моноклональных антител, конъюгированных с флуоресцентными метками FITC/PE/PC5: IgG1(mouse)/IgG1(mouse)/CD45, CD3/CD19/CD45, CD3/CD4/CD45, CD3/CD8/CD45, CD3/ CD(16+56)/CD45, CD3/HLA-DR/CD45, CD3/CD25/CD45 (Beckman Coulter, США).

Результаты и обсуждение. У детей 1 группы отмечается относительный Т-лимфоцитоз в 48,0% случаев за счет повышения содержания NKT-лимфоцитов (36,8%), активированных CD25+Т-клеток (25,7%), цитотоксических Т-лимфоцитов (24,8%), Т-хелперов (13,5%). Соотношение (CD3+CD4+/CD3+CD8+) снижено у 47,1% детей. Снижение абсолютного и относительного числа Т-лимфоцитов с маркером активации HLA-DR диагностируется у 29,4% детей. В В-клеточном звене абсолютное угнетение экспрессии маркера CD19 выявляется у 35,3% детей, относительное — у 23,5%. Абсолютное и относительное количество NK-клеток снижено у 23,5% обследованных. При этом у 17,6% отмечается снижение относительного содержания активированных CD8+NK. Таким образом, развитие ANCA-ГН сопровождается признаками иммунодефицитного состояния.

У детей 2 группы в 63,4% случаев отмечается относительный Т-лимфоцитоз за счет повышения относительного содержания Т-хелперов (34,5% обследованных), цитотоксических Т-лимфоцитов (24,7% детей), обеспечивающих адекватный противовирусный иммунитет за счет продукции цитокинов, а также прямого цитотоксического действия. У 26,2% обследованных выявляется снижение относительного количества Т-хелперов, что вместе со снижением в 51% случаев иммунного соотношения свидетельствует о развитии иммунодефицитного состояния и поддерживает длительную персистенцию вируса. У детей с ВА-ГН отмечается снижение относительного количества NK-клеток (50% детей), активированных CD8+NK (30% случаев), NKT-лимфоцитов (12,5% детей), что обуславливает недостаточность противовирусной активности клеточного иммунитета и может способствовать переходу острой инфекции в хроническую форму. Относительная и абсолютная В-лимфоцитопения (34,7% и 29,2% случаев, соответственно) коррелирует с гипоиммуноглобулинемией А (r=–0,63 и r=–0,99, соответственно).

Выводы. Обнаруженные изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов при различных типах ГН свидетельствуют о развивающемся вторичном иммунодефицитном состоянии, обуславливают снижение резистентности к инфекции, способствуя осложненному течению заболевания, а также персистирование имеющейся вирус-

ной инфекции. Лечение любого типа ГН должно сопровождаться исследованием субпопуляционного состава лимфоцитов для назначения индивидуальной иммуномодулирующей терапии.

Литература

1. *Хмелевская И. Г., Жизневская И. И., Разинькова Н. С.* Прогностическое значение иммунологических показателей при гломерулонефритах у детей // Научные ведомости белгородского государственного университета.— 2014.— Т. 28, № 24-1 (195). С. 56–59.
2. *Соболева М. К., Аверкина Е. Н., Тимохина В. П., Зорькина Т. В.* ANCA-ассоциированный васкулит в педиатрической практике // Вестник новосибирского государственного университета.— 2014.— Т. 12, № 3.— С. 111–115.
3. *Кирьянов Н. А., Бочкарев А. Н., Иванова Н. А., Трифонов С. Ю.* ANCA-ассоциированные васкулиты // Здоровье, демография, экология финно-угорских народов.— 2014.— № 3.— С. 67–69.
4. *Нечепоренко Н. В., Калинина Н. М., Савенкова Н. Д.* Гломерулонефриты, ассоциированные с вирусной инфекцией у детей и подростков // Нефрология.— 2010.— Т. 14, №2. С. 35–45.
5. *Соловьева А. С.* Противовирусный иммунитет // Бюллетень физиологии и патологии дыхания.— 2015.— № 56.— С. 113–118.

СИСТЕМА ИНСУЛИНОПОДОБНЫХ ФАКТОРОВ РОСТА ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЯИЧНИКОВ

[1]Э. Р. Исаева, [2]Д. Н. Кушлинский, [1]С. В. Мишков

[1]Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

[2]Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

biochimia@yandex.ru

В возникновении и прогрессии различных злокачественных опухолей одну из ключевых ролей играет сигнальная система инсулиноподобных факторов роста, которая включает: лиганды (ИФР-I, ИФР-II), инсулин, 4 типа трансмембранных рецепторов и как минимум шесть ИФР-связывающих белков (ИФРСБ) крови, секретируемых различными тканями организма и связывающих ИФР [1, 2]. Известно, что ИФР выступают в качестве ауто/паракринных медиаторов, опосредующих рост, метастазирование и антиапоптотические ответы злокачественных клеток. Данные о роли сывороточных уровней ИФР и ИФРСБ в диагностике и прогнозе рака яичников противоречивы [3–5].

Цель настоящего исследования — сравнительный анализ содержания ИФР-I, ИФР-II и ИФРСБ-1, -2, -3 в сыворотке крови здоровых женщин, в опухолях и сыворотке крови больных раком, доброкачественными и пограничными опухолями яичников, оценка этих маркеров в диагностике и прогнозе рака яичников.

Материалы и методы. Обследовали 16 больных доброкачественными, 14 — пограничными, 74 — злокачественными опухолями яичников в возрасте от 20 до 82 лет. В группу контроля включили 77 здоровых женщин в возрасте от 24 до 84 лет. Содержание маркеров определяли в экстрактах опухолей яичников и сыворотке крови реактивами для прямого ИФА «IGF-I-ELISA», «IGF-II-ELISA», «IGFBP-1-ELISA», «IGFBP-2-ELISA», «IGFBP-3-ELISA» (Mediagnost®, Германия). При сопоставлении показателей использовали непараметрические критерии (Манна-Уитни, тест Краскелла-Уоллиса). Выживаемость оценивали методом Каплана-Мейера и регрессионной многофакторной моделью Кокса.

Результаты исследования. Не выявлено значимых различий содержания ИФР-I, -II и ИФРСБ-1, -3 в различных опухолях яичников, и только уровень ИФРСБ-2 в ткани рака яичников был достоверно выше, чем в пограничных и доброкачественных новообразованиях. Не отмечено достоверных корреляционных связей уровней исследованных маркеров в опухолях с возрастом больных, репродуктивным статусом, стадией опухоли, характером и масштабом диссеминации по брюшине, наличием асцита.

Выявлено 4 потенциальных серологических маркера рака яичников, а по степени значимости их можно расположить: ИФРСБ-2>ИФРСБ-1> ИФР-II>ИФР-I. После анализа диагностических характеристик этих маркеров методом построения кривых ROC, выявили только 3 из них — чувствительных и специфичных для рака яичников: ИФРСБ-2, ИФРСБ-1, ИФР-I. Высокая диагностическая чувствительность и специфичность продемонстрирована для ИФРСБ-2: при пороговом его значении 370 нг/мл и эти показатели равны, соответственно 87 и 79%, причем высокую специфичность наблюдали не только по отношению к контролю, но и по отношению к пациенткам с доброкачественными новообразованиями яичников. Для ИФРСБ-1 максимальная чувствительность при пороговом его уровне 4,8 нг/мл составила 79%, специфичность по отношению к контролю — 74%. Достаточно хорошими диагностическими параметрами (чувствительность 71%, специфичность 74%) по отношению к контролю характеризовалось и снижение уровня ИФР-I ниже 125 нг/мл. Чувствительность и специфичность ИФР-II не превышали 61 и 69%. Чувствительность всех маркеров, кроме ИФР-I, в диагностике пограничных опухолей яичников снижалась. Уровни ИФРСБ-1, -2 и ИФР-I зависели от степени распространенности рака яичников, соответственно, увеличиваясь (ИФРСБ-1 и -2) или снижаясь (ИФР-I) по мере развития процесса, а ИФРСБ-2 оставался значимым диагно-

стическим маркером даже при Ia-Ib стадиях заболевания. В тоже время, уровень ИФР-I значимо изменялся только при распространенном процессе (со стадии Ic).

Отдаленные результаты проследили у 64 больных раком яичников на протяжении от 1 до 76,3 месяца. Однофакторный анализ с построением кривых Каплана-Мейера выявил 5 статистически значимых неблагоприятных факторов прогноза с учетом их уровня: в сыворотке крови ИФР-I <87 нг/мл (p<0,001), ИФРСБ-2 >650 нг/мл (p<0,01), ИФРСБ-1 >4,8 нг/мл (p<0,01); в опухоли ИФР-II >0,6 нг/мг белка и ИФРСБ-1 >0,2 нг/мг белка. Многофакторный анализ выявил независимое прогностическое значение только сывороточного уровня ИФР-I.

Заключение. Исследование выявило нарушения баланса ИФР/ИФРСБ у больных раком яичников и позволило предложить комплекс маркеров с высокой чувствительностью и специфичностью для выявления заболевания. Перспективным маркером оказался ИФРСБ-2, (диагностическая специфичность 80%, чувствительность >85%) даже на ранних стадиях рака яичников, а низкий уровень ИФР-I указывал на неблагоприятный прогноз заболевания. С прогнозом рака яичников также связаны уровни ИФР-II и ИФРСБ-1 в опухоли.

Литература

1. IGF-I in epithelial ovarian cancer and its role in disease progression / Brokaw J., Katsaros D., Wiley A., Lu L., Su D., Sochirca O., de la Longrais I. A., Mayne S., Risch H., Yu H. // Growth Factors.— 2007.— Vol. 25, № 5.— P. 346–354.
2. *Huang G. S., Brouwer-Visser J., Ramirez M. J. et al.* Insulin-like growth factor 2 expression modulates Taxol resistance and is a candidate biomarker for reduced disease-free survival in ovarian cancer // Clin. Cancer Res.— 2010. –Vol. 16, № 11.— P. 2999–3010.
3. *Bruchim I., Werner H.* Targeting IGF-1 signaling pathways in gynecologic malignancies // Expert. Opin. Ther. Targets.— 2013.— Vol. 17, № 3.— P. 307–320.
4. High insulin-like growth factor-2 (IGF-2) gene expression is an independent predictor of poor survival for patients with advanced stage serous epithelial ovarian cancer / Sayer R. A., Lancaster J. M., Pittman J., Gray J., Whitaker R., Marks J. R., Berchuck A. // Gynecol. Oncol.— 2005.— Vol. 96, № 2.— P. 355–361.
5. IGF axis gene expression patterns are prognostic of survival in epithelial ovarian cancer / Spentzos D., Cannistra S. A., Grall F., Levine D. A., Pillay K., Libermann T. A., Mantzoros C. S. // Endocr. Relat. Cancer.— 2007.— Vol. 14, № 3.— P. 781–790.

СУБПОПУЛЯЦИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ $CD4^+CD25^{hi}$ И $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low/-}$ TREG- ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

[1]П. Н. Кравченко, [1]А. В. Чуров, [1]Е. К. Олейник, [1]Г. А. Жулай, [1]В. М. Олейник, [2]О. Ю. Барышева, [2]И. М. Марусенко

[1]Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия

[2]Петрозаводский государственный университет, Россия

k-polina13@mail.ru

Введение. Регуляторные Т-лимфоциты (Treg) [1] играют важную роль в патогенезе ревматоидного артрита (РА) — тяжелого аутоиммунного заболевания неясной этиологии [2, 3]. Однако в случае РА в литературе нет единого мнения о роли и содержании этих клеток в периферической крови больных [2–4]. Отмечается увеличение количества Treg-клеток в синовиальной жидкости сустава у больных РА [3]. Предполагается, что ассоциированный с Treg-клетками хемокиновый рецептор CCR4 может участвовать в регуляции миграции Treg-клеток к местам локального воспаления [5]. Поэтому изучение состояния пула Treg-клеток, обеспечивающих иммунологическую толерантность, является актуальным для понимания патогенеза РА и разработки эффективных методов лечения.

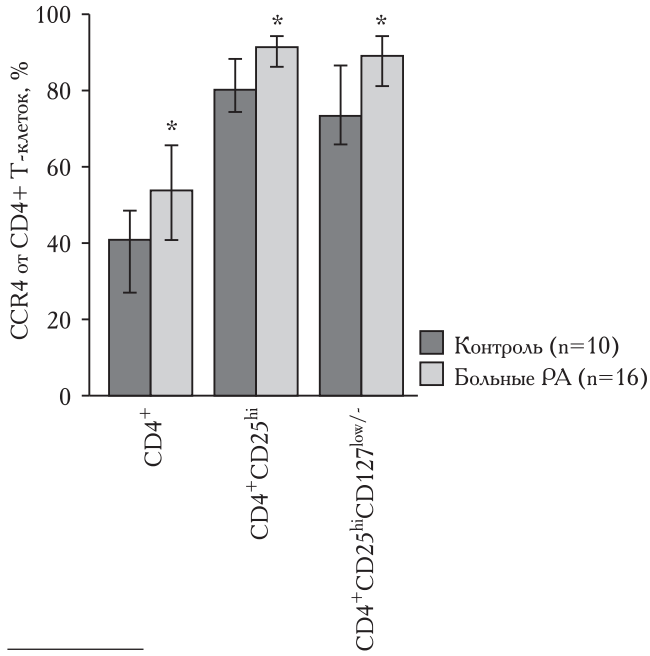
Целью нашей работы являлась оценка уровня активации Treg-клеток по уровню экспрессии молекулярных маркеров CD4, CD25, CD127, и хемокинового рецептора CCR4 в периферической крови больных РА.

Материалы и методы. В работе исследованы образцы периферической крови 16 больных РА, средний возраст которых составил 60,9±7,35 лет, и 10 здоровых лиц, сопоставимых по возрасту. Все пациенты получали терапию базисными противовоспалительными препаратами. Оценку содержания популяций лимфоцитов проводили методом многоцветной проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 («Beckman Coulter», США). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0, достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна-Уитни при уровне значимости p<0,05. Исследование выполнено с применением приборов Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН (ЦКП НО ИБ КарНЦ РАН).

Результаты исследования. Было определено содержание Treg-клеток с фенотипами $CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low/-}$ в периферической крови больных РА (n=16) и здоровых доноров (n=10). Анализ полученных данных показал, что у больных РА содержание $CD4^+CD25^{hi}$ (2,7±1,0) и $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low/-}$ (2,5±1,0) Treg-клеток увеличено по сравнению с контролем (1,5±0,8; 1,6±0,9% от CD4+лимфоцитов, соответственно, p<0,05).

Миграция лимфоцитов из кровотока к местам локального воспаления обеспечивается секрецией ряда хоминговых

рецепторов (CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 и т.д.), в частности, ассоциированного с Treg-клетками хемокинового рецептора CCR4. Из результатов проведенного исследования следует, что у больных РА уровень экспрессии данного рецептора на $CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^{hi}$



Примечание. * — различия достоверны по сравнению с контролем при p<0,01. Данные представлены как M±SD.

Рисунок. Уровень экспрессии CCR4 Т-лимфоцитами периферической крови больных РА.

$CD127^{low/-}$ Treg-клетках был выше (p<0,01), чем в контроле (рис.). Также повышенная экспрессия CCR4 наблюдалась и на $CD4^+$ Т-лимфоцитах у больных РА по сравнению с контролем (рис.), в то время как экспрессия этого рецептора относительно общего числа лимфоцитов была на уровне контроля (31,72±10,2% и 32,31±7,4%, соответственно).

Заключение. В периферической крови больных РА отмечено увеличенное количество $CD4^+CD25^{hi}$, $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low/-}$ Treg-клеток, что говорит о роли этих популяций в развитии РА. Показано повышение уровня экспрессии хемокинового рецептора CCR4, который, по-видимому, более активно участвует в регуляции миграции Т-лимфоцитов с периферии в синовиальную жидкость сустава у больных РА.

Финансирование проекта осуществлялось на средства Гранта Президента РФ (МК-3680.2015.7), РФФИ (№ 16-04-00567) и из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0011.

Литература

1. *Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C. M., Hafler D. A.* FoxP3+ regulatory T cells in the human immune system // Nat. Rev. Immunol.— 2010.— Vol. 10.— P. 490–500.
2. *Kawashiri S.-Y., Kawakami A., Okada A. et al.* $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$-Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis // J Rheumatol.— 2011.— Vol. 38.— P. 2517–2521.
3. *Moradi B., Schnatzer P., Hagmann S., et al.* $CD4^+CD25^{+/high}CD127^{low/-}$ regulatory T cell are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints — analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluide and peripheral blood // Arthritis Res. Ther.— 2014.— Vol. 16., № 2.— R97.
4. *Aerts N. E., Dombrecht E. J., Ebo D. G. et al.* Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis // Cell Immunol.— 2008.— Vol. 251.— P. 109–115.
5. *Campbell D. J., Koch M. A.* Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells // Nat. Rev. Immunol.— 2011.— Vol. 11.— P. 119–130.

МЕТОД МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ПО СОСТАВУ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА

А. Г. Кузьмин, Е. И. Ткаченко, Л. С. Орешко, Ю. А. Титов, А. С. Балабанов
Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

agqz55@rambler.ru

Выдыхаемый воздух является наиболее легкодоступной субстанцией для неинвазивного анализа и медицинской диагностики [1]. Поэтому необходимо разрабатывать и внедрять в медицинскую практику методы анализа состава выдыхаемого воздуха как дополнение или альтернативу традиционным клиническим методам анализа биологических жидкостей.

Для реализации медицинской экспресс-диагностики по выдыхаемому воздуху был разработан малогабаритный транспортабельный квадрупольный масс-спектрометр МС7–200 с прямым капиллярным вводом пробы воздуха при атмосферном давлении [2–3]. Это позволило разработать новый объективный метод медицинского экспресс-анализа: масс-спектрометрическая аромадиагностика [4–5], при котором регистрируются различные компоненты выдыхаемого воздуха в виде индивидуального отпечатка в широком диапазоне концентраций и в режиме реального времени. Поскольку большинство заболеваний имеют свои характерные отпечатки (специфические наборы диагностических маркеров в выдыхаемом воздухе, концентрации которых лежат в определенных диапазонах), то из массива этих характерных отпечатков может быть сформирована база данных для вероятностной экспресс-диагностики соответствующих заболеваний.

В зависимости от вида отпечатка может быть вычислена вероятность наличия того или иного заболевания.

Применение метода позволит существенно ускорить и повысить достоверность диагностического процесса, осуществлять оперативный мониторинг эффективности проводимых профилактических и лечебных мероприятий.

Разработанный макет масс-спектрометра был протестирован в экспериментах по контролю содержания микропримесей в выдыхаемом воздухе здоровых и больных людей в клиниках СЗГМУ им. И. И. Мечникова и ВМА им. С. М. Кирова. Пациенты клиники производили выдох в тестовые емкости, образцы анализировались на масс-спектрометре в режиме реального времени. Для обработки полученных результатов и вероятностной экспресс-диагностики заболеваний были разработаны специальные методы математического кластерного анализа [6].

Состав выдыхаемого воздуха практически здоровых пациентов, как правило, содержит три основных компонента: ацетон, уксусная кислота, изопрен. Их концентрации лежат в диапазоне 0,05÷0,1 ppm. Содержание указанных компонентов у здоровых людей могут варьироваться в некоторых пределах нормы (±20÷30%) в зависимости от состояния человека и от его индивидуальных особенностей. Однако более сильные отклонения от средних значений могут указывать на наличие определенных заболеваний. У пациентов клиники были зафиксированы существенные изменения концентрации основных компонент, а так же дополнительные компоненты, такие как 1 Pentyn -3ol, 3 methyl, Limonene, 1,3 Butadiyne, 2 Propen 1 amine и др. Концентрации этих примесей оцениваются на уровне 0,05÷0,5 ppm.

Таким образом, достигнутая на разработанном масс-спектрометре чувствительность анализа является достаточной для обнаружения большинства диагностических маркеров.

Литература

1. *Buszewski B., Kesy M., Ligor T., Amann A.* Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases // Biomed. Chromatogr.— 2007.— Vol. 21.— P. 553–566.
2. *Кузьмин А. Г.* Квадрупольный масс-спектрометр. / Патент на полезн. мод. №94763 РФ, 27.05.2010 г.
3. *Кузьмин А. Г., Титов Ю. А.* Малогабаритные масс-спектрометры для динамических исследований состава выдыхаемого воздуха. Труды I международной научно-практической конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», 23–26 ноября 2010 г.— СПб.: Изд-во СПбГПУ, 2010.— Ч. 3.— С. 266–270.
4. *Кузьмин А. Г., Ткаченко Е. И., Орешко Л. С., Титов Ю. А.* Перспективы метода масс-спектрометрической аромадиагностики по составу выдыхаемого воздуха // Материалы десятой Евразийской научной конференции «Донозология — 2014», 18–19 декабря 2014 года.— СПб., 2015.— С. 229–231.
5. *Кузьмин А. Г., Титов Ю. А.* Малогабаритные квадрупольные масс-спектрометры для анализа состава газовых сред в медицине и экологии // Вакуумная техника и технология.— 2015.— Т. 25, № 2.— С. 35–36.
6. *Манойлов В. В., Кузьмин А. Г., Титов Ю. А.* Метод обработки сигналов масс-спектров выдыхаемых газов на основе спектрального разложения в адаптивном базисе // Масс-спектрометрия.— 2015.— Т. 12, № 3.— С. 194–200.

КРИСТАЛЛОСКОПИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ, ОСУЩЕСТВЛЯЕМОЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АЗОТА

А. К. Мартусевич, А. В. Разумовский, Л. К. Ковалёва, А. А. Мартусевич

Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр Министерства здравоохранения РФ, Нижний Новгород, Россия

Нижегородская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ, Россия

Кировская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ, Россия

Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, Россия

cryst-mart@yandex.ru

В настоящее время описаны различные варианты проведения биорадикальной терапии (БРТ), среди которых наиболее широко известным и активно применяемым является озонотерапия. Данная медицинская технология, основанная на системном или локальном использовании озона, озоно-кислородных смесей и озонированных растворов, реализует свои саногенетические эффекты через индукцию процессов образования в тканях и биологических жидкостях различных радикалов [1, 2]. На этом основании ее и следует классифицировать как вариант БРТ.

С другой стороны, постепенно раскрываются возможности иных технологий БРТ, в частности, NO-терапии, применения синглетно-кислородной газовой смеси и т.д. [3–5]. Как и в отношении любых других методов лечения, для вариантов БРТ необходимы информативные и, по возможности, специфичные инструменты оценки ее эффективности. При этом в настоящее время спектр подобных методов крайне ограничен и преимущественно представлен рутинными неспецифическими тестами, выбор которых определяется исключительно корректируемым заболеванием или патологическими состоянием [1, 6]. Практически единственной альтернативой, позволяющей проводить мониторинг эффектов именно БРТ, служит биохемилюминесцентная оценка интенсивности сво-

боднорадикальных процессов и суммарной антиоксидантной активности биологических жидкостей, в первую очередь — крови. Поэтому **целью работы** явилось уточнение диагностической информативности применения методов биокристалломики для оценки эффективности БРТ.

На протяжении последних лет нами на различных моделях *in vitro* (образцы крови человека) и *in vivo* (здоровые и имеющие термическую травму крысы; пациенты с термической травмой и др.) изучаются перспективы использование методов биокристалломики для решения задач свободнорадикальной биологии и медицины [1, 3].

Проведенные исследования позволили установить наличие у активных форм кислорода (газообразная озоно-кислородная смесь, озонированный физиологический раствор) и оксида азота (как в форме NO-содержащей воздушной смеси, так и в виде физиологического депонирующего соединения — динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами) дозозависимого действия на метаболические показатели крови и тканей, причем общей тенденцией данной реакции является ее двухфазный характер с относительно четким экстремумом [1, 3, 4]. Это позволило разработать и протестировать прогностическую значимость особой технологии индивидуализации дозы лечебного агента — биокристалломного претеста. Он основан на выборе той дозы/концентрации соединения из предполагаемого диапазона, которая вызывает в биологической жидкости пациента формирование ответной реакции на уровне экстремума в предварительном тесте *in vitro*. Наши предшествующие экспериментально-клинические исследования позволили продемонстрировать высокую прогностическую ценность биокристалломного претеста в отношении эффективности последующей БРТ.

Вторым аспектом применения методов биокристалломики в БРТ является проведение непосредственной оценки динамики кристаллогенных свойств биологических жидкостей в процессе лечения, осуществляемого с использованием источников активных форм кислорода и азота. Установлено, что обнаружение нормализации кристаллоскопической картины биосред или отчетливой тенденции к ней служит информативным индикатором эффективности БРТ. Это показано нами на примере мониторинга ответа организма на системную озонотерапию у пациентов с термической травмой, алкогольным абстинентным синдромом и т.д., а также на ингаляционную NO-терапию. При этом в качестве оценочных критериев кристаллоскопического теста могут быть использованы как морфологическое описание фаций, так и стандартные визуаметрические параметры (кристаллизуемость, индекс структурности, степень деструкции фации, выраженность краевой белковой зоны и др.).

Заключение. В целом, проведенные исследования дали возможность на экспериментальных моделях и клиническом материале продемонстрировать прогностическую значимость и ценность в качестве инструмента текущего мониторинга эффективности БРТ методов биокристалломики. Дальнейшие изыскания могут позволить уточнить и адаптировать к различным лечебным агентам и корректируемым патологическим состояниям указанные технологии кристаллоскопического анализа биологических жидкостей.

Литература

1. *Перетягин С. П., Стручков А. А., Мартусевич А. К., Костина О. В., Лузан А. С.* Применение озона как средства детоксикации в раннем периоде ожоговой болезни // Скорая медицинская помощь.— 2011.— Т. 12, №3.— С. 39–43.
2. *Vieban R.* Ozon-Sauerstoff-Therapie.— Haug, 2007.— 106 p.
3. *Мартусевич А. К., Ковалева Л. К., Давыдюк А. В.* Оксид азота в модуляции кристаллогенных свойств биологической жидкости // Биофизика.— 2016.— Т. 61, № 2.— С. 345–351.
4. *Мартусевич А. А., Перетягин С. П., Мартусевич А. К.* Молекулярные и клеточные механизмы действия синглетного кислорода на биосистемы // Современные технологии в медицине.— 2012.— № 2.— С. 128–134.
5. *Kumar P. et al.* Use of inhaled nitric oxide in preterm infants // Pediatrics.— 2014.— Vol. 133, №1.— P. 164–170.
6. *Griendling K. K., FitzGerald G. A.* Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS // Circulation.— 2003.— Vol. 21.— P. 1912–1916.

ПРОАНГИОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ

В. В. Муштенко, П. В. Глыбин, А. В. Колпаков, А. А. Морозов

Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

biochimia@yandex.ru

Пристальное внимание онкологи уделяют изучению процессов неоангиогенеза, так как доказано, что опухоль не может расти без адекватного снабжения кислородом [1]. Ключевым активатором ангиогенеза считают фактор роста эндотелия сосудов (*VEGF*) — мультифункциональный цитокин, вызывающий пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток [2, 3], активацию урокиназы и коллагеназы, в результате происходит лизис эндотелиального матрикса, что повышает способность опухолевых клеток к инвазии и метастазированию [1]. При этом, *VEGF* проявляет свои биологические эффекты посредством взаимодействия с тремя рецепторами (типичные рецепторы тирозинкиназы) на поверхности эндотелиальных клеток: *VEGFR1* (*flt-1*), *VEGFR2* (*KDR/Flk-1*) и *VEGFR3* (продукт гена *flt-4*) [2, 4]. После прикрепления *VEGF* к экстрацеллюлярной области рецептора, димеризации и аутофосфорилирования последнего, внутриклеточный участок рецептора способствует запуску

каскадной активации протеинов, которые в свою очередь воздействуют на разные этапы ангиогенеза [5].

Цель настоящего исследования — анализ содержания *VEGF* и растворимой формы его рецептора 2 типа (*VEGFR-2*) в сыворотке крови, опухоли и непораженной паренхиме почки у больных почечноклеточным раком с учетом клинико-морфологических характеристик заболевания.

Материалы и методы. В исследование включено 37 больных (18 мужчин и 19 женщин) раком почки в возрасте от 33 до 78 лет. Рак почки у всех выявлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования опухоли. Группу контроля составили 57 практически здоровых людей соответствующего возраста (12 мужчин и 45 женщин). У большинства (29/78,4%) выявлен светлоклеточный рак почки, папиллярный и хромофобный варианты — по 4 наблюдения. Больные были в различных стадиях опухолевого процесса: $T_{1a}N_0M_0$ (10/27%), $T_{1b}N_0M_0$ (9/24,3%), $T_{1b}N_0M_1$ (1/2,7%), $T_2N_0M_0$ (6/16,6%), $T_{3a}N_0M_0$ (6/16,25%), $T_{3b}N_0M_0$ (4/10,8%), $T_{3b}N_1M_0$ (1/2,7%). Все больные раком почки были подвергнуты хирургическому лечению различного объема. *VEGF* и *VEGFR-2* определяли в сыворотке крови, в цитозольной фракции опухоли и непораженной паренхимы почки ИФА реактивами фирмы «R&D systems» (США). Содержание ангиогенных факторов в цитозоле выражали в пг/мг белка, определенного по Лоури.

Результаты исследования. Во всех исследованных образцах рака и гистологически неизмененной паренхимы почки выявлены *VEGF* и *VEGFR2*, а уровни их варьировали в достаточно широких пределах. Однако, содержание *VEGF* в опухолях преобладающего числа больных (87%) было выше, чем в гистологически неизмененной ткани, при этом различия медианных значений этого показателя в опухоли (525 пг/мг белка) и нормальной ткани (62,8 пг/мг белка) были высокодостоверными ($p<0,001$). Повышение содержания *VEGFR2* в опухолях отмечено только у 39% больных и различия в уровне маркера между опухолью и неизмененной паренхимой почки не значимы. Уровень *VEGFR-2* в сыворотке крови больных раком почки не зависел от гистологического варианта строения опухоли, будь то светлоклеточный, папиллярный и хромофобный рак. Не обнаружено связи между исходным содержанием *VEGFR-2* в сыворотке крови больных раком почки и максимальным размером, характером роста опухоли, ее локализацией в анатомических отделах почки и таких клинических признаков как боль и макрогематурия. Не обнаружено корреляционных связей между уровнями *VEGF* и *VEGFR2* в ткани опухоли и между этими показателями в неизмененной паренхиме почки. В то же время уровни *VEGFR2* в опухоли и нормальной ткани почки были достоверно связаны ($r=0,41$, $p=0,02$); для *VEGF* такой взаимосвязи не отмечено. Увеличение степени злокачественности почечноклеточного рака (критерия Fuhrman) — неблагоприятного фактора прогноза выживаемости данной категории больных, сопровождалось достоверным повышением уровней *VEGF*, *VEGFR-2* в сыворотке крови, при этом в цитозоле опухоли обнаружено снижение *VEGFR-2* и повышение продукции *VEGF*. Установлено достоверное повышение сывороточного уровня *VEGFR-2* у больных раком почки при увеличении ядерного индекса G ($p=0,04$). У большинства больных почечноклеточным раком с инвазией псевдокапсулы опухоли обнаружены высокие показатели *VEGFR-2* в сыворотке крови.

Заключение. Уровень экспрессии *VEGF* в цитозоле опухоли следует считать перспективным биологическим маркером почечноклеточного рака при оценке распространенности первичной опухоли. Показатели *VEGF* и *VEGFR-2* в периферической крови больных раком почки не претерпевают значимых изменений в сравнении со здоровыми, поэтому не могут быть использованы как диагностические маркеры. Повышенная продукция *VEGF* и *VEGFR-2* в ткани почечноклеточного рака позволяет рассматривать эти биологические маркеры в качестве мишеней антиангиогенной терапии.

Литература

1. *Folkman J.* Antiangiogenesis: new concept for therapy of solid tumors // Ann. Surg.— 1972.— Vol. 175, № 3.— P. 409–416.
2. *Ferrara N., Gerber H. P., LeCouter J.* The biology of VEGF and its receptors // Nat. Med.— 2003.— Vol. 9, № 6.— P. 669–676.
3. *Welsh S. J., Fife K.* Pazopanib for the treatment of renal cell carcinoma // Future Oncol.— 2015.— Vol. 11, № 8.— P. 1169–1179.
4. Inhibition of the VEGF/VEGFR pathway improves survival in advanced kidney cancer: a systematic review and meta-analysis / Iacovelli R., Sternberg C. N., Porta C., Verzoni E., de Braud F., Escudier B., Procopio G. // Curr. Drug Targets.— 2015.— Vol. 16, № 2.— P. 164–170.
5. *Rini B. I., Small E. J.* Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma // J. Clin. Oncol.— 2005.— Vol. 23, № 5.— P. 1028–1043.

ИНСУЛИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА (ИФР) И ИФР-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

А. А. Николаев, Е. А. Короткова, О. И. Костылева

Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

singen85@gmail.com

Колоректальный рак (КРР) — одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний, занимающее 3-е место в структуре смертности от злокачественных новообразований. Несмотря на успехи в диагностике,

совершенствовании хирургических и комплексных методов лечения, КРР у большинства пациентов выявляют в поздних стадиях. Дальнейший прогресс в повышении эффективности лечения КРР связывают не только с рациональным использованием уже существующих методов терапии, но и с разработкой принципиально новых патогенетических методов терапии, основанных на современных достижениях в изучении биохимии и молекулярной биологии опухолей.

Важную роль в возникновении и прогрессии различных злокачественных опухолей играет сигнальная система-ИФР, включающая лиганды (ИФР-I, ИФР-II), их трансмембранные клеточные рецепторы и связывающие белки крови (ИФРСБ). Экспериментальные и клинико-лабораторные исследования свидетельствуют о том, что в клетках КРР присутствуют все компоненты, необходимые для реализации аутокринного механизма действия ифр-I и ифр-II [1–3]. Уровни и соотношение различных компонентов системы ИФР в периферической крови неразрывно связаны с факторами питания, которые, в свою очередь, играют ключевую роль в этиологии КРР [4, 5]. При этом, высокий уровень ИФР-I считают фактором повышенного риска КРР [6]. Пристальный интерес к исследованию системы-ИФР при КРР связан с возможностью использования «таргетных» ингибиторов для подавления ее активности.

Цель данного исследования — сравнительная оценка содержания ИФР-I и ИФР-II, ИФРСБ-1, -2 и -3 типа в сыворотке крови больных КРР и практически здоровых людей, а также анализ взаимосвязи изученных показателей с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания.

Материалы и методы. Обследовано 95 больных КРР (50 мужчин и 45 женщин) в возрасте от 20 до 85 лет: рак прямой кишки (n=56), рак ободочной кишки (26), рак анального канала (10), рак слепой кишки (3); I стадия диагностирована у 19, II — у 32, III — у 27 и IV — у 17 больных. В группу контроля вошли 17 практически здоровых мужчин и 31 женщина в возрасте от 29 до 84 лет. Сывороточные уровни ИФР-I, -II, ИФРСБ-1, -2, -3 определяли прямым ИФА до начала лечения реактивами компании «Mediagnost» (Германия).

Результаты исследования. Обнаружено высоко достоверное увеличение медианных уровней ИФР-I и ИФРСБ-2 и снижение ИФРСБ-3 у больных КРР по сравнению с контролем. Как в контроле, так и у больных РТК обнаружена достоверная отрицательная корреляция между возрастом и содержанием ИФР-I в сыворотке крови (R=-0,29; p=0,014 и R=-0,76; p=0,0001, соответственно). Другие показатели достоверно не были связаны с возрастом пациентов и контроля.

На основании многофакторного анализа разработано эффективное решающее правило для распознавания злокачественных опухолей толстой кишки: пороговые уровни составили для ИФР-I — до 60 лет — выше 181 нг/мл, от 60 до 69 лет — выше 150 нг/мл, от 70 лет и старше — выше 112 нг/мл; для ИФРСБ-2 — более 853 нг/мл, и для ИФРСБ-3 — ниже 2,5 мкг/мл. Чувствительность этого комбинированного теста для диагностики КРР составила 94,9% [95%ДИ=87,5–98,6%], специфичность 83,9% [95%ДИ=66,3–94,6%].

В группе контроля уровни ИФР-II, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 были достоверно выше в сыворотке крови женщин по сравнению с мужчинами (во всех случаях $p<0,01$). У больных КРР аналогичные достоверные различия отмечены только для ИФРСБ-3 ($p<0,05$). При этом, если в общей группе пациентов уровни ИФР-II не отличались от контроля, то у больных мужчин показатели этого маркера достоверно превышали в контроле ($p<0,01$). Содержание ИФР и ИФРСБ в сыворотке крови не связано с распространенностью КРР, его локализацией, гистологическим строением и степенью дифференцировки опухоли.

Заключение. Не выявлено значимых взаимосвязей уровней ИФР и ИФРСБ в сыворотке крови больных КРР с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания. Вместе с тем, обнаружены изменения содержания сывороточных компонентов системы-ИФР у больных КРР, свидетельствующие об увеличении свободного ИФР-I (увеличение соотношения ИФР-I/ИФРСБ-3) и его биодоступности для тканей (увеличение уровня ИФРСБ-2). С использованием маркеров системы-ИФР разработано эффективное решающее правило для распознавания злокачественных опухолей толстой кишки.

Литература

1. *Davies M., Gupta S., Goldspink G., Winslet M.* The insulin-like growth factor system and colorectal cancer: clinical and experimental evidence // Int. J. Colorectal Dis.— 2006.— Vol. 21, № 3.— P. 201–208.
2. *Fu P., Thompson J. A., Leeding K. S., Bach L. A.* Insulin-like growth factors induce apoptosis as well as proliferation in LIM 1215 colon cancer cells // J. Cell. Biochem.— 2007.— Vol. 100, № 1.— P. 58–68.
3. Expression of insulin-like growth factor system components in colorectal tissue and its relation with serum IGF levels / Vrieling A., Voskuil D. W., Bosma A., Majoor D. M., van Doorn J., Cats A., Depla A. C., Timmer R., Witteman B. J., Wesseling J., Kampman E., Van't Veer L. J. // Growth Horm. IGF Res.— 2009.— Vol. 19, № 2.— P. 126–135.
4. *Giovannucci E.* Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence // J. Nutr.— 2001.— Vol. 131 (11 Suppl).— P. 3109S–3120S.
5. *Jenab M., Riboli E., Cleveland R. J., Norat T., Rinaldi S. et al.* Serum C-peptide, IGFBP-1 and IGFBP-2 and risk of colon and rectal cancers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition // Int. J. Cancer.— 2007.— Vol. 121, № 2.— P. 368–376.
6. *Rinaldi S., Cleveland R., Norat T., Biessy C., Rohrmann S. et al.* Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer risk: results from the EPIC cohort, plus a meta-analysis of prospective studies // Int. J. Cancer.— 2010.— Vol. 126, № 7.— P. 1702–1715.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ SNAI1, SNAI2, NF-κB И РЕГУЛЯТОРЫ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

[1]*О. Г. Овсий*, [2]*А. М. Щербаков*, [1]*Е. И. Алексеева*, [2]*Л. К. Овчинникова*
[1]Московский медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова Минздрава России, Россия
[2]Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

xana347@gmail.com

Рак молочной железы (РМЖ) — самое распространенное онкологическое заболевание у женщин. Данные, опубликованные *Global Burden of Disease Cancer Collaboration*, свидетельствуют о том, что ежегодно более чем у 1,8 млн пациенток выявляется эта опухоль [1]. Смертность от этого заболевания не уменьшается: ежегодно умирает более 460 тыс. человек [1]. Одной из причин высокой смертности при РМЖ считают недостаточную эффективность гормоно- и химиотерапии, а также резистентности к препаратам. Именно поэтому поиск новых фармакологических мишеней и дальнейшее исследование сигнальных путей РМЖ являются важными задачами онкологии. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) — комплексный процесс изменения фенотипа клеток от эпителиального к мезенхимальному и представляет последовательность запрограммированных морфогенетичеких событий, которая запускается в ответ на стимуляцию ряда сигнальных путей [2]. Центральным событием в инициации ЭМП является активация транскрипционных факторов семейства *Snail* — *SNAI1* и *SNAI2/SLUG*, которые вызывают снижение синтеза белка Е-кадгерина и последующее ослабление клеточных контактов [3]. Роль регуляторов ЭМП в развитии РМЖ активно обсуждается, однако единого мнения об особенностях экспрессии этих показателей в опухолевых клетках не существует.

Цель настоящего исследования — иммуногистохимический анализ уровня экспрессии белков *SNAI1*, *SNAI2*, *NF-κB* (одного из коактиваторов *Snail*), *VEGF* и его рецепторов первого и второго типа в опухолях больных РМЖ.

Материалы и методы. В исследование включили 157 больных РМЖ: 112 — протоковый инфильтративный рак, 23 — дольковый инфильтративный рак, 11 — тубулярный рак, другие типы РМЖ — единичные наблюдения. Большинство опухолей (111) имели II, 25 — III, и 19 — I степень злокачественности.

Иммуногистохимическим методом (ИГХ) выполнен анализ следующих показателей: *SNAI1*, *SNAI2*, *NF-κB*, *VEGF-A* и его рецепторов 1 и 2 типа (*VEGFR1*, *VEGFR2*), Ki67 и HER2/neu. Статистическую обработку данных проводили в программе *Statistica 6.0* («*StatSoft*»). Для анализа корреляционных зависимостей использовали непараметрический тест Спирмена (R). Для анализа значимости взаимосвязи исследуемых показателей в группах применяли тесты χ^2 и Фишера. Различия и корреляции считали достоверными при $p<0,05$.

Результаты исследования. У 84 (54%) больных РМЖ экспрессия *SNAI1* не выявлена. РМЖ с высокой экспрессией *SNAI1* не обнаружено, а умеренный или низкий уровень экспрессии *SNAI1* определен в 72 образцах опухолей, что суммарно составило 46%. Распределение опухолей по уровню экспрессии *SNAI2* характеризовалось, напротив, большим количеством образцов со значительной экспрессией фактора: группы с умеренным и высоким уровнем экспрессии *SNAI2* составили суммарно более 65% наблюдений. Уровни экспрессии *SNAI1* и *SNAI2* достоверно положительно коррелировали ($R=0,55$; $p<0,05$), что может указывать на одновременный синтез этих белков-регуляторов ЭМП в РМЖ.

Обнаружено, что транскрипционный фактор *NF-κB* (один из коактиваторов *Snail*) не экспрессирован в 50% РМЖ, а приблизительно в четверти случаев уровень экспрессии этого показателя охарактеризован как очень низкий. Выявлена небольшая группа (24%) образцов *NF-κB*-позитивных РМЖ; только в одной опухоли выявлен высокий уровень экспрессии *NF-κB*. Уровни экспрессии *NF-κB* и *SNAI1*, а также *SNAI2* достоверно коррелировали ($R=0,54$ и 0,46 соответственно; $p<0,05$).

Уровни экспрессии основных белков-регуляторов неоангиогенеза, *VEGF* и *VEGFR1*, слабо, но достоверно коррелировали ($R=0,19$; $p<0,05$); выявлена также слабая корреляция уровней экспрессии *VEGF* и *VEGFR2* ($R=0,19$; $p<0,05$). Оценка взаимосвязи экспрессии белков-регуляторов ЭМП и компонентов VEGF-сигнального пути продемонстрировала следующие тенденции: уровень экспрессии как *SNAI1*, так и *SNAI2* достоверно и положительно взаимосвязан с уровнем экспрессии *VEGFR1* (в обоих случаях $R=0,44$; $p<0,05$). Корреляционная взаимосвязь уровней экспрессии *VEGFR2* с экспрессией *SNAI1* и *SNAI2* также имеет выраженный положительный характер ($R=0,53$ и 0,51 соответственно; $p<0,05$). Более чем в 100 наблюдениях выявлена коэкспрессия *VEGFR2* и *SNAI2* в РМЖ. Таким образом, в РМЖ прослеживается координированная активация белков-регуляторов ЭМП и основных компонентов *VEGF*-сигнального пути.

Заключение. В представленном исследовании впервые на клиническом материале продемонстрирована координированная активация белков-регуляторов ЭМП (*Snail*) и основных компонентов *VEGF*-сигнального пути в РМЖ. В частности, полученные данные могут свидетельствовать о важной роли процессов ЭМП в регуляции неоангиогенеза. В целом, суммируя представленные результаты и данные литературы можно заключить, что белок *SNAI2* экспрессируется в более 65% случаев РМЖ и является одним из основных факторов, поддерживающих рост и прогрессию опухоли.

Литература

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C., Dicker D., Pain A. et al. The Global Burden of Cancer 2013 // JAMA Oncol.— 2015.— Vol. 1, № 4.— P. 505–527.

2. *Kaufhold S., Bonavida B.* Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention // J. Exp. Clin. Cancer Res.— 2014. 33. P. 62. doi: 10.1186/s13046-014-0062-0.

3. *Foroni C., Broggini M., Generali D., Damia G.* Epithelial-mesenchymaltransition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact // Cancer Treat. Rev.— 2012.— Vol. 38, № 6.— P. 689–697.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ ПТИЦ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ В СЭНДВИЧ-МЕТОДЕ ТЕСТИРОВАНИЯ HBS-АНТИГЕНА

А. А. Печелюлько, Ю. Н. Тараканова

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

yaguar2224@mail.ru

Использование поликлональных антител (ПКА) птиц класса *IgY* в иммунохимических исследованиях и для лабораторной диагностики инфекционных заболеваний — сравнительно новое и, как считается, перспективное направление иммунохимии (получившее название «*IgY*-технологии»). Предполагается, что ПКА кур имеют ряд преимуществ по сравнению с антителами другой видовой специфичности. Среди них: возможность получения антител иной эпитопной специфичности, чем при иммунизации мышей, кроликов и других млекопитающих; низкая неспецифическая кроссреактивность птичьих антител по отношению к антигенам млекопитающих и человека; сравнительная дешевизна метода и биоэтические преимущества — возможность выделения значительного количества *IgY* из желтков куриных яиц.

Высказывались предположения, что куриные ПКА могут со временем в значительной мере заменить моноклональные антитела (МКА). В 1996 г. Европейский центр по оценке альтернативных методов (*The European Centre for the Validation of Alternative Methods*) рекомендовал использование *IgY* вместо *Ig*G млекопитающих как альтернативный подход исследовательской практики, а в 1999 г. «IgY-техника» была одобрена Министерством ветеринарии правительства Швейцарии [1–3].

Целью исследования являлось изучение антигенсвязывающей способности ПКА кур по сравнению с моноклональными антителами (МКА) мышей и ПКА млекопитающих (коз) на модели твердофазного иммуноферментного анализа (сэндвич-метода) для определения поверхностного антигена вируса гепатита В (*HBsAg*).

В настоящей работе данный вопрос проанализирован на модели сэндвич-метода определения *HBsAg*. В качестве «эталона» для сравнения был выбран полученный нами ранее высокочувствительный иммуноферментный сэндвич-метод определения *HBsAg* с минимальной детектируемой дозой 0,017 нг/мл. Дополнительной группой сравнения являлись аффинноочищенные козьи ПКА, ввиду их частого использования в качестве детектирующих в сэндвич-методах определения вирусных антигенов. В задачу работы входило выяснение вопроса о том, удастся ли заменить один из компонентов «эталона» ПКА, без снижения аналитической чувствительности метода.

Было обнаружено, что ПКА кур проявляют более высокую способность связывать меченый пероксидазой *HBsAg* при их адсорбции на твердую фазу полистироловых планшетов (в сравнении с мышиными МКА *18С8* или козьими ПКА). Однако использование этих ПКА в сэндвич-методе определения *HBsAg*, вопреки ожиданиям, не приводило к улучшению аналитической чувствительности метода. Под аналитической чувствительностью метода понимался тангенс угла наклона калибровочной кривой к оси концентраций. Наблюдалось, что оптимальные насыщающие концентрации куриных антител составляли 6–12 мкг/мл и в 2–4 раза превышали оптимальную концентрацию адсорбируемых МКА (3 мкг/мл). Сходным образом, оптимальные концентрации детектирующих куриных антител также были существенно выше (1,5–2,5 мкг/мл, в сравнении с 50 нг/мл для детектирующих МКА и 10 нг/мл для ПКА коз). В целом, имело место снижение аналитической чувствительности сэндвич-метода на 30% при использовании куриных ПКА в качестве иммобилизованных и примерно на порядок при их применении в качестве детектирующих агентов в сравнении с МКА.

Это позволило предположить, что в условиях сэндвич-метода на процессы взаимодействия антиген-антитело могут влиять факторы, связанные с авидностью. В частности, более низкая гибкость молекул *IgY* (по сравнению с *Ig*G) может затруднять бивалентное связывание и образование высокоавидных иммунных комплексов в сэндвич-методе.

Однако данные факты и предположения не отрицают возможности использования ПКА кур в лабораторной диагностике инфекционных, в том числе, вирусных болезней. Скорее они указывают на важность определения адекватных областей применения таких антител с учетом их физико-химических свойств.

Литература

1. *Schade R., Calzado E. G, Sarmiento R., Chacana P. A, Porankiewicz-Asplund J., Terzolo H. R.* // Altern Lab Anim.— 2005.— Vol. 33, № 2.— P. 129–154.
2. *Dias da Silva W., Tambourgi D. V.* // Vet Immunol Immunopathol.— 2010.— Vol. 135, № 3–4.— P. 173–180.
3. *Spillner E., Braren I., Greunke K., Seismann H., Blank S., du Plessis D.* // Biologicals.— 2012.— Vol. 40, № 5.— P. 313–322.

РАЗЛИЧНЫЕ ПАРЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ВЫЯВЛЯЮТ РАЗНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАСТВОРИМОГО ЭНДОГЛИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

И. В. Смирнов, И. В. Грязева, М. П. Самойлович, Л. А. Терехина, И. Ю. Крутецкая, О. А. Шашкова, В. Б. Климович

Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург, Россия

smirnov.iv.mail@gmail.com

Эндоглин (CD105) представляет собой трансмембранный гомодимерный гликопротеин с молекулярным весом 180 кДа. Он экспрессирован на мембранах клеток эндотелия, мезенхимных стволовых клеток и синцитиального трофобласта. Эндоглин в растворимой форме выявляют в плазме крови и моче. Единственным известным механизмом его образования является протеолитическое отщепление экстраклеточной части молекулы матриксной металлопротеиназой-14. Оценка концентрации эндоглина имеет прогностическое значение для ряда онкологических заболеваний солидной природы, диагностики преэклампсии у беременных женщин и мониторинга атеросклеротических процессов.

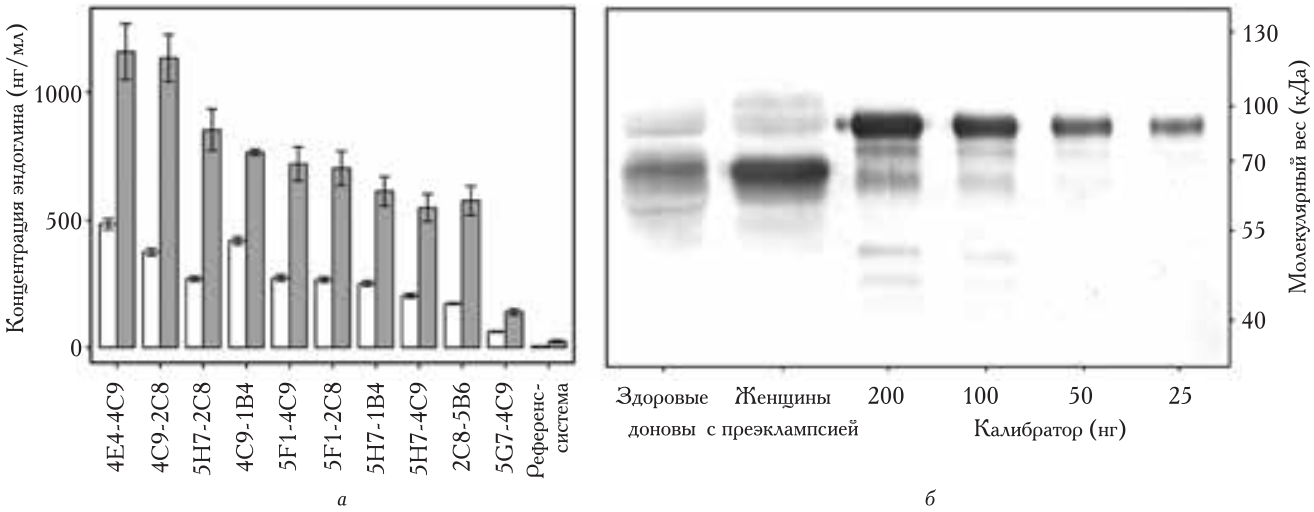


Рисунок. *а* — Различия в оценках концентрации растворимого эндоглина в пулированных образцах плазмы крови здоровых доноров (белые столбцы) и женщин с преэклампсией (серые столбцы) при использовании разных систем двухцентрового ИФА (n=3, среднее±стд. откл.). *б* — Гетерогенность молекул растворимого эндоглина, выделенных из плазмы крови здоровых доноров и женщин с преэклампсией. На четыре соседние дорожки нанесли 200, 100, 50 и 25 нг калибрующего реагента. Электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях. Выявление антигена с помощью МКАТ 2E1.

В лаборатории гибридомной технологии ФГБУ РНЦРХТ создана новая панель моноклональных антител (МКАТ) к эндоглину, включающая двенадцать реагентов. Десять из них (МКАТ 1B4, 2C8, 3G2, 4C9, 4E4, 4G8, 5B6, 5F1, 5G7 и 5H7) специфичны к конформационным эпитопам и взаимодействуют с антигеном, экспрессированным на поверхности клеток. Два других МКАТ (2E1 и 4B7) связывают линейные эпитопы. С помощью рекомбинантных фрагментов эндоглина и метода конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) установлено относительное взаиморасположение распознаваемых детерминант.

Пары антител, специфичные к пространственно удаленным эпитопам, были использованы для разработки двухцентровых систем ИФА, выявляющих растворимый эндоглин. Калибрующим реагентом служил коммерческий рекомбинантный белок, представляющий экстраклеточный домен эндоглина человека (1097-EN-025, R&D Systems). Для исследования были отобраны 10 наиболее чувствительных иммуноферментных систем. Референсом служил коммерческий набор для выявления растворимого эндоглина (DNDG00, R&D Systems). Тестирование пулированных образцов плазмы крови, полученных от здоровых доноров и пациенток с преэклампсией, показало, что определяемое содержание антигена зависит от пар МКАТ, используемых в двухцентровых системах. Наибольшие значения концентрации эндоглина выявлены с помощью системы, состоящей из адсорбированных на твердую фазу МКАТ 4E4 и конъюгированных с пероксидазой хрена МКАТ 4C9 (4E4–4C9). Наименьшие значения определены с помощью референс-системы (рис. 1, *а*). Различия в оценках содержания эндоглина в образцах достигали двух порядков.

Верификация специфичности разработанных систем ИФА выполнена путем удаления антигена из образцов плазмы крови посредством иммобилизованных на твердом носителе МКАТ к эндоглину 2C8. Все иммуноферментные системы детектировали отсутствие специфичного антигена в плазме крови, пропущенной через иммуноаффинную колонку. Напротив, в элюируемых с колонки растворах выявляли до 90% антигена, находившегося в исходных образцах.

Эндоглин, выделенный из плазмы крови здоровых доноров и женщин с преэклампсией, исследовали методом вестерн-блота. Тестируемые образцы содержали по 200 или по 2,6 нг антигена, согласно оценкам, сделанным в системе 4E4–4C9 или коммерческим наборе, соответственно. Выявление эндоглина с помощью МКАТ 2E1 показало, что в плазме крови присутствуют как минимум четыре фракции антигена с молекулярными весами 90, 81, 70 и 62 кДа (рис. 1, *б*). Методом денситометрического анализа установлено, что образцы, полученные от здоровых доноров и женщин с преэклампсией, содержали 140 и 230 нг антигена, соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что молекулярная гетерогенность растворимого эндоглина может служить одним из объяснений различий в оценках его концентраций в разных системах ИФА. Фрагменты антигена с низким молекулярным весом могут не выявляться ввиду отсутствия в них специфичных сайтов распознавания МКАТ.

Содержание растворимого эндоглина также было исследовано в индивидуальных образцах плазмы крови, полученных от здоровых доноров, здоровых беременных женщин и женщин с преэклампсией. Несмотря на существенные различия в абсолютных показателях, все исследованные двухцентровые системы ИФА показали одну и ту же тенденцию. В плазме крови здоровых беременных женщин отмечено небольшое увеличение содержания антигена по сравнению с контрольной группой, тогда как у пациенток с преэклампсией наблюдалась усиленная продукция растворимой формы эндоглина.

ВЛИЯНИЕ pH БУФЕРА НА АДСОРБЦИЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ТВЕРДОФАЗНОМ ИФА

Ю. Н. Тараканова, А. А. Печелюлько

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

ytarakanova@mail.ru

Иммуноферментный анализ (ИФА) является на сегодняшний день широко используемым инструментарием как научных исследований, так и практической диагностики. Современные варианты ИФА обычно предполагают использование моноклональных антител (МКА). При этом прямая адсорбция является наиболее распространенным способом иммобилизации МКА на поверхность твердой фазы, однако при использовании данного подхода может возникнуть ряд трудностей, связанных со значительными (более 90%) потерями биологической активности МКА [1]. Имеется большое число работ, посвященных анализу влияния pH на адсорбцию разнообразных антигенов, однако вопрос о воздействии pH на биологическую активность адсорбированных антител в литературе освещен весьма скудно.

Целью настоящей работы было изучение изменения активности МКА в зависимости от используемых при пассивной адсорбции буферов с различными значениями pH (1; 2,8; 7,5; 9,6 и 11,9).

Работу проводили на полученной в лаборатории панели из 41 МКА. Наряду с анализом антигенсвязывающей активности, в работе изучали (с помощью радиоиммунологического метода) влияние указанных буферов на поверхностную концентрацию антител, иммобилизованных на твердой фазе, и количество активных антигенсвязывающих сайтов. Это позволило непосредственно

Таблица

Количество антител, адсорбированных на поверхность полистироловых планшетов при различных значениях pH

МКА	18C8				
pH при адсорбции	1	2,8	7,5	9,5	11,9
Количество антител (нг/лунку, среднее±доверительный интервал, n=8)	165,4±1,3	154,0±2,2	**290,6±5,0**	234,1±1,7	207,8±4,3
Количество активных антител (нг/лунку, среднее±доверительный интервал, n=8)	—	**36,4±1,1** (23,6%)	18,0±0,9 (6,2%)	—	—
МКА	D5B4				
Количество антител (нг/лунку, среднее±доверительный интервал, n=8)	154,2±1,3	154,4±1,1	255,9±1,5	163,9±4,4	203,5±2,7
Количество активных антител (нг/лунку, среднее±доверительный интервал, n=8)	—	31,4±1,8 (20,3%)	15,1±1,7 (5,9%)	**37,2±2,5** (18,3%)	—

Полоски полистироловых планшетов насыщали антителами при указанных значениях pH и определяли концентрацию активных антигенсвязывающих сайтов.

Примечания:

1) В скобках указан процент активных антител от общего количества адсорбированных;

2) Жирным шрифтом выделены максимальные концентрации активных антител, характерные для данного клона при указанных значениях pH.

оценить долю антител, сохраняющих активность после адсорбции в буферах с разными значениями pH [2].

Оказалось, что около 30% МКА проявляют более высокую антигенсвязывающую активность при адсорбции в «жестких» условиях (pH 1,0, 2,8 или 11,9), по сравнению с обычно используемыми в ИФА адсорбирующими буферами с pH 7,5 и 9,6 (см. табл., стр. 115). Показано, что наблюдаемое увеличение антигенсвязывающей активности МКА при их адсорбции в «жестких» условиях было обусловлено трёх-четырёхкратным увеличением фракции антител, сохранивших свою биологическую активность после иммобилизации на твердой фазе (по сравнению с адсорбцией при физиологическом значении pH). Наблюдаемая гетерогенность МКА в отношении сохранения их биологической активности при адсорбции в буферах с различными pH может быть связана с отличиями в заряде и степени гидрофобности вариабельных участков легких и тяжелых цепей антител. Эти факторы могут определять ориентацию и конформационное состояние молекул антител (в зависимости от условий их адсорбции). Принято считать, что «правильная» ориентация молекул антител на твердой фазе — это ориентация, при которой антигенсвязывающие участки обращены в раствор, так как подобное расположение обеспечивает их максимальную биологическую активность [3, 4]. В своей совокупности, полученные данные могут позволить более эффективно конструировать конкурентные и сэндвич-методы тестирования.

Литература

1. *Butler J. E., N.L., Ni L., Nessler R., Joshi K. S., Suter M., Rosenberg B., Chang J., Brown W. R., Cantarero L. A.* // J. Immunol. Methods.— 1992.— Vol. 150, № 1–2. P. 77–90.
2. *Dmitriev A. D., Tarakanova J. N., Yakovleva D. A., Dmitriev D. A., Phartooshnaya O. V., Kolyaskina G. I., Massino Y. S., Borisova O. V., Segal O. L., Smirnova M. B., Ulanova T. I., Lavrov V. F.* // J. Immunoassay Immunochem.— 2013.— Vol. 34(4).— P. 414–37.
3. *Esser P.* // Thermo Sci. Nunc Bull.— 1988.— № 6. P. 1–5.
4. *Greenwood F. G., Hunter W. M., Glover J. S.* // Biochem. J.— 1963.— Vol. 89 (1). P. 114–123.

СИСТЕМА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА В ОЦЕНКЕ ПРОГНОЗА ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ

[1]Ю. С. Тимофеев, [2]А. В. Бондарев, [2]М. Ю. Щупак

[1]Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

[2]Московская городская онкологическая больница № 62, Москва, Россия

timofeev_lab@mail.ru

Саркомы костей — группа онкологических заболеваний, характеризующаяся трудностями ранней диагностики, агрессивным течением, резистентностью к проводимой терапии. Прогноз сарком костей крайне неблагоприятен [1–3]. Система-ИФР играет важную роль в костном метаболизме и участвует в туморогенезе различных вариантов сарком костей [4]. В то же время значение сывороточных уровней компонентов системы-ИФР у пациентов с опухолями костей изучено недостаточно [5].

Цель настоящего исследования — оценка значения инсулиноподобных факторов роста I и II типа (ИФР-I, ИФР-II), а также ИФР-связывающих белков (ИФРСБ-1, ИФРСБ-3) в сыворотке крови больных первичными саркомами костей в прогнозе безрецидивной и общей выживаемости.

Материалы и методы. Обследовали 110 больных новообразованиями костей в возрасте от 18 до 69 лет и среди них 74 пациента со злокачественными опухолями: остеосаркома (25), хондросаркома (21), саркома Юинга (18), недифференцированная плеоморфная саркома (5), хордома (5); 14 пациентов — с пограничными опухолями (гигантоклеточная опухоль кости — ГКО); 22 пациента с доброкачественными новообразованиями костей. В контрольную группу включили 50 практически здоровых людей. Пациенты с саркомами костей получали неоадъювантную и адъювантную химиотерапию согласно принятым схемам. За период наблюдения в течение 3-х лет от начала специфического лечения у 45,1% больных злокачественными и пограничными опухолями костей развились рецидивы в виде отдаленных метастазов, а 39,6% пациентов с саркомами костей умерли от прогрессирования основного заболевания. Концентрацию ИФР-I, ИФР-II, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 определяли в сыворотке крови до лечения прямым иммуноферментным анализом с помощью реактивов компании *Diagnostic System Laboratories, Inc.* (США). Выживаемость больных оценивали методом Каплана-Мейера, а также с помощью регрессионной многофакторной модели Кокса.

Результаты исследования. На основании ретроспективного анализа выявили, что в общей группе больных саркомами костей уровни ИФР-I в сыворотке крови достоверно связаны с прогнозом безрецидивной и общей выживаемости. Так, у пациентов с ИФР-I⩽243 нг/мл 1-летняя безрецидивная выживаемость составила 80,9%, 3-летняя — 70,1%; у больных с ИФР-I>243 нг/мл показатели 1- и 3-летней безрецидивной выживаемости составили соответственно 66,2% и 43,1% (медианы соответственно 31,5 и 14,5 мес.) Достоверно отличались также медианы общей выживаемости в группе пациентов с низкими и высокими значениями ИФР-I (соответственно 47 и 25 мес.). Выявлена связь высоких уровней ИФР-I с неблагоприятным прогнозом безрецидивной выживаемости среди больных хондросаркомой, что позволяет предположить о возможном использования ИФР-I как фактора прогноза безрецидивной выживаемости. Медиана безрецидивной

выживаемости у больных саркомой Юинга с уровнями ИФР-I >243 нг/мл была в 2 раза ниже, чем с уровнем маркера ≤243 нг/мл. Показатели 1- и 3-летней безрецидивной выживаемости больных с низкими значениями ИФР-II (≤1968 нг/мл) составили 77,5% и 65,1%; а с высокими значениями ИФР-II (>1968 нг/мл) — 66,6% и 40,2% соответственно. Достоверность данных различий не подтвердилась критерием *log-rank* (p=0,11), однако выявлены достоверные отличия в медианах безрецидивной выживаемости — 13 и 43,5 мес. с высокими и низкими значениями ИФР-II. Аналогичная тенденция в различии медиан выживаемости отмечена в группе больных саркомой Юинга. Выявлены достоверные различия в показателях безрецидивной выживаемости (при пороговом уровне ИФРСБ-1 — 31 нг/мл) как в общей группе больных злокачественными опухолями костей, так и у пациентов с саркомой Юинга. Выявлена достоверная связь (p=0,045) повышенных уровней ИФРСБ-1 в сыворотке крови с неблагоприятным прогнозом общей выживаемости у больных саркомами костей. Анализ в группах с различными гистологическими вариантами сарком костей выявил различия в показателях 3-летней общей выживаемости среди пациентов с саркомой Юинга при высоких и низких значениях сывороточного ИФРСБ-1 — 29,9% и 78,4% соответственно. В группе больных остеосаркомой с уровнями ИФРСБ-3 в сыворотке крови ≤5845 и >5845 нг/мл 1-летняя безрецидивная выживаемость составила 76,9% и 57,9%, 3-летняя — 56,6% и 11,6%. При остеосаркоме и саркоме Юинга высокие значения ИФРСБ-3 ассоциированы с неблагоприятным прогнозом безрецидивной и общей выживаемости.

Заключение. Представленные данные свидетельствуют о возможности использования некоторых маркеров системы-ИФР в оценке прогноза сарком костей. Дальнейшие исследования в этом направлении помогут более детально охарактеризовать прогностическое значение основных компонентов системы-ИФР при различных гистологических вариантах сарком костей с учетом основных клинико-морфологических характеристик заболевания.

Литература

1. *Мусаев Э. Р.* Первичные опухоли позвоночника // Практическая онкология.— 2010.— Т. 11, № 1.— С. 19–24.
2. *Bishop M. W., Janeway K. A., Gorlick R.* Future directions in the treatment of osteosarcoma // Curr. Opin. Pediatr.— 2016.— Vol. 28, № 1.— P. 26–33.
3. *Unni K. K., Inwards C. Y.* Dahlin's Bone Tumors: General Aspects and Data on 10,165 Cases (6th edition) // Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 2010.— P. 10–98.
4. *Ressler S., Radhi J., Aigner T.* Insulin-like growth factor-binding protein-3 in osteosarcomas and normal bone tissues // Anticancer Res.— 2009.— Vol. 29, № 7.— P. 2579–2587.
5. The progress of molecular diagnostics of osteosarcoma / Li C., Cong Y., Liu X., Zhou X., Zhou G., Lu M., Shi X., Wu S. // Front Biosci. (Landmark Ed.).— 2016. Vol. 21.— P. 20–30.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДРЕНИРОВАНИЯ ПОЧКИ У БОЛЬНЫХ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ С ОБСТРУКТИВНЫМИ УРОПАТИЯМИ

А. И. Хотько, Н. Б. Захарова, Д. Н. Хотько, Э. Б. Попыхова

Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского Министерства здравоохранения РФ, Россия

pivovarova-nastya@ya.ru

В исследованиях последних лет получены убедительные доказательства, что у пациентов с обструктивными уропатиями воспалительные процессы формируют на уровне почечной паренхимы замкнутую патологическую систему, в которой участвуют тубулярный эпителий, нейтрофилы и макрофаги, а главной мишенью становится эндотелий. Панель из мочевых биомаркеров, позволяющих оценить тяжесть повреждения почечной паренхимы представляют моноцитарный хемоаттрактант (MCP-1), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), интерлейкин-8 (*IL-8*) [1, 2, 3]. Уровень данных маркеров в моче может быть использован для оценки динамики воспалительных процессов у больных с обструктивной уропатией на этапе разрешения обструкции, а также оптимизации сроков дренирования почки.

Цель исследования: обосновать сроки чрескожного дренирования полостной системы почки путем сравнительной оценки уровня биомаркеров воспаления и ангиогенеза в моче больных с обструктивными уропатиями в динамике.

Материалы и методы. Всего обследовано 40 больных с мочекаменной болезнью, проходивших лечение в НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии СГМУ за период с сентября 2015 г. по апрель 2016 г. Из них в динамике лечения до и после дренирования полостной системы обследовано 20 пациентов в возрасте от 26 до 60 лет с наличием конкремента лоханочно-мочеточникового сегмента, размерами от 1 до 1,5 см, вызывающих клинику обструкции верхних мочевыводяших путей (основная группа) без клинических проявлений обструктивного пиелонефрита. 20 пациентов с конкрементами лоханки, без явлений обструкции составили группу сравнения. Всем пациентам помимо принятой схемы обследования проводилось определение панели биомаркеров методом твердофазного

иммуноферментного анализа (ИФА). Исследование биомаркеров у пациентов, включенных в основную группу, проводили в динамике лечения: до дренирования (1 точка), через 7 дней от момента разрешения обструкции (2 точка), через 14 дней после дренирования (3 точка), затем на 21 и 28 сутки (соответственно 4 и 5 точки), у группы сравнения однократно.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета *SPSS Statistic 17*. В качестве критерия достоверности отличия между двумя независимыми группами использовали непараметрический критерий (*U*) Манна-Уитни. Во всех процедурах статистического анализа принимался уровень значимости $p<0,05$.

Результаты. По результатам проведенных исследований следует, что наиболее выраженный подъем концентрации в образцах мочи в точке 1, относительно контрольной группы, получен для цитокина *IL-8* (таблица). Исходя из полученных данных уровень *IL-8* до дренирования составляет 37,5 пг/мл, $p<0,05$, у пациентов группы сравнения — 0,4 пг/мл. Отмечается тенденция к умеренному снижению к 7 суткам, после разрешения обструкции, с подъемом к 14 и 21 суткам, однако к 28 суткам отмечается снижение уровня *IL-8* ниже дооперационных значений, однако полученные показатели и к этим срокам остаются высокими по сравнению с контрольной группой.

При анализе полученных результатов MCP-1 показано, что исходно уровень данного биомаркера повышен (614,9 пг/мл) относительно группы сравнения (253 пг/мл), $p<0,05$, через 7 суток после дренирования почки (точка 2) содержание *MCP-1* в моче снижается, с незначительным повышением к 14 суткам, но далее отмечается снижение, ниже показателей группы сравнения.

Концентрация VEGF до дренирования полостей почки и на 7-е сутки после разрешения обструкции показывают высокие значения (322,4 пг/мл) и (342,6 пг/мл) соответственно, $p<0,05$. К 14 суткам имеется тенденция к отчетливому снижению показателя, продолжающееся к 21 и 28 суткам, не достигая, однако, значений группы сравнения (33 пг/мл), $p<0,05$.

Выводы.

1. Подъем концентрации *VEGF*, *IL-8*, *MCP-1* является одним их показателей степени повреждения гломерулярного аппарата почек у больных с обструктивными уропатиями.
2. Исходя из полученных значений выбранной панели биомаркеров, положительная динамика отмечается с 21-х суток, что при дальнейшем исследовании позволит оптимизировать сроки дренирования и выполнения второго этапа оперативного лечения.

Литература

1. *Gianfrancesco F., Esposito T.* // Multifactorial disorder: molecularand evolutionary insights of uric acid nephrolithiasis. Minerva Med. 2005; № 96 (6). P. 409–416.
2. *Lau Y.L., Tu W.* Case-control study of Sichuan and Hong Kong children with melamine-associated renal stones: renal ultrasonography and urinary IL-8 and MCP-1 levels. Hong Kong Med J. 2013 Dec; 19 Suppl. 8: P. 26–30.
3. *Suen J.L., Liu C. C., Lin Y. S., Tsai Y. F., Juo S. H., Chou Y. H.* // Urinary chemokines/cytokines are elevated in patients with urolithiasis. Urol Res.— 2010 Apr.— Vol. 38, № 2. P. 81–87.

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ПРОБОПОДГОТОВКИ НА РЕЗУЛЬТАТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В КРОВИ

[1]К. А. Черемисина, [1]К. С. Бабин, [2]А. А. Пахомова, [3]Е. Г. Степанова, [1]Г. Е. Яковлева

ЗАО «Вектор-Бест»

[1]Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, Россия

[2]Новосибирский государственный медицинский университет, Россия

cheremisina@vector-best.ru

Для определения многих аналитов в крови человека принято использовать ее сыворотку или плазму: при этом плазму рассматривают как эквивалент сыворотке. В то же время доказано, что концентрация или активность некоторых веществ в этих двух, казалось бы, одинаковых образцах крови существенно отличается. Связано это с тем, что сыворотку получают в результате естественного свертывания крови, а для приготовления плазмы применяют специальные вещества-антикоагулянты. В медицинских лабораториях для определения активности ферментов чаще всего используют два вида антикоагулянтов: гепарин и этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Возможность использования плазмы в качестве образца наряду с сывороткой определяется экспериментально. В большинстве работ, посвящённых данному вопросу, рассматривается определенный вид плазмы (чаще всего гепаринизированной) и реагенты конкретного производителя с точки зрения их влияния на результат [1]. Целью данного исследования было сравнение активности десяти основных ферментов в образцах гепаринизированной плазмы, ЭДТА-плазмы и сыворотки крови людей при использовании реагентов российского производства.

У 100 пациентов обоих полов в возрасте от 18 до 40 лет отбирали натощак три пробы венозной крови с помощью закрытых вакуумных систем для получения сыворотки (СВ), гепаринизированной плазмы (Г) и ЭДТА-плазмы крови (Э). Образцы хранили при минус 20° С не более трех дней вплоть до использования. Активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), α-амилазы общей (АМ) и панкреатической (п-АМ), γ-глутамилтрансферазы (ГГТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), α-гидроксибутират-

дегидрогеназы (ЛДГ-1), креатинкиназы (КК), холинэстеразы (ХЭ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) определяли в одной аналитической серии кинетическими методами с помощью наборов реагентов «Вектор-Бест» (Россия).

Статистические параметры были рассчитаны с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0. Распределения результатов активности ферментов были приведены к нормальным путем логарифмической трансформации. При использовании t-критерия Стьюдента ($p<0,05$) установлена значимость различия средних значений активностей ферментов (таблица).

Таблица

Концентрация цитокинов в моче пациентов с обструктивными уропатиями и группы сравнения

Определяемый биомаркер	Среднее значение, диапазон квартильных отклонений					
	Группа сравнения, n=20	Больные с обструктивными уропатиями, n=20				
		До дренирования	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки
VEGF, пг/мл	313 19–41	333,8* 77,1–703,9	342,6* 86,7–1450	273,2* 59–520,5	192,4* 126–247	134,1* 57,2–246
MCP-1, пг/мл	253 159–287	661,3* 259–1983	473,6* 163,9–839,8	630,7* 95,8–1358	84,2* 11,58–197	377,2* 131–720
IL-8, пг/мл	0,4 0,0–12,1	49* 8,17–117	33,1* 7,55–94,07	48,2* 7,9–105,8	46,4* 11,6–113,9	29,1* 6,03–100,1

* $p<0,05$ в сравнении с группой сравнения.

Показано значимое различие средних значений активности аминотрансфераз в ЭДТА-плазме и активности ГГТ в гепаринизированной плазме по сравнению с результатами в сыворотке. Щелочная фосфатаза полностью ингибировалась ЭДТА. Это указывает на то, что пробы, полученные таким способом, нельзя применять для анализа данных ферментов. Показатели ЛДГ-1 в ЭДТА-плазме, а ЛДГ в обоих видах плазмы имели большой разброс и существенно превышали значения в сыворотке крови. Полученные нами данные согласуются с рекомендациями различных сообществ лабораторной медицины использовать для анализа активности ЛДГ исключительно сыворотку крови вследствие высокой вероятности загрязнения образцов плазмы тромбоцитами, содержащими большое количество ЛДГ. Для остальных ферментов различия значений их активности в гепаринизированной плазме, ЭДТА-плазме и сыворотке крови не были значимыми.

Отдельного рассмотрения заслуживают результаты активности общей и панкреатической α-амилазы, поскольку принято считать, что для ее определения в качестве антикоагулянта следует применять гепарин [2]. В настоящей работе определение активности α-амилазы и ее изофермента было выполнено с помощью реагентов, основанных на методе с субстратом *2-chloro-4-nitrophenyl-4-O-β-D-galactopyranosylmaltoside* [3, 4]. Полученные данные убедительно продемонстрировали преимущества данного метода вне зависимости от способа подготовки крови к анализу. Таким образом, возможности использования плазмы крови в энзимодиагностике лимитированы, что обусловлено как уникальными физико-химическими свойствами самих ферментов, так и модифицируемыми условиями пробоподготовки. Внедрение в практику новых методов энзимологии позволяет не только повысить качество биохимических исследований в целом, но и устранить ряд существенных ограничений на преаналитическом этапе.

Литература

1. Comparison of serum and heparinized plasma samples for measurement of chemistry analytes / Han Q., Sun X., Zhang N., Tang N., Tan L., Hoffman R. // Clin.Chem.— 2004.— Vol. 50 (9).— P. 1704–1705.
2. *Меньшиков В. В.* Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап. М.: Юнимед-пресс, 2003.
3. *Яковлева Г. Е., Черемисина К. А.* Реагент для определения общей α-амилазы. Патент № 2417374 Россия, 2011.
4. *Яковлева Г. Е., Черемисина К. А.* Набор реагентов для определения активности панкреатической α-амилазы. Патент № 2417373 Россия, 2011.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ИХ ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА 1 ТИПА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ

[1]*И. С. Черномаз*, [2]*И. В. Бабкина*, [3]*А. В. Бондарев*, [1]*И. Н. Кузнецов*
[1]Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Россия
[2]Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия
[3]Московская городская онкологическая больница № 62, Россия
marvel2602@mail.ru

Саркомы костей — крайне агрессивные злокачественные опухоли, склонные к быстрому гематогенному метастазированию. Поиск новых мишеней химиотерапии и биологических маркеров, характеризующих метастатический потенциал этих опухолей, имеет важное клиническое значение. Известно, что в механизмах инвазии и метастазирования опухолей активное участие принимают матриксные металлопротеиназы (ММП). Во время роста новообразований отмечено повышение синтеза ММП опухолью и инфильтрующими ее иммунокомпетентными клетками. Исследования показали, что в одной из самых распространенных опухолей костей — остеосаркоме имеет место гиперэкспрессия ММП-9 [1]. Отмечена корреляционная связь между содержанием ММП-9 в остеосаркоме и прогнозом заболевания [1, 2]. В ткани остеосаркомы обнаружены также ММП-2, -8, -13, -26 и ТИМП-1 [3].

Цель настоящего исследования — сравнительный анализ содержания ММП-2, -7, -9 и их тканевого ингибитора ТИМП-1 в сыворотке крови больных первичными опухолями костей и практически здоровых людей.

Материалы и методы. Обследовали 54 больных (29 мужчин, 25 женщин) с локализованной опухолью кости в возрасте от 14 до 59 лет: типичная остеосаркома (21), периостальная остеосаркома (4), саркома Юинга (11), первичная хондросаркома (6), недифференцированная плеоморфная саркома (3) и 9 больных пограничными новообразованиями (гигантоклеточная опухоль кости — ГКО). Всем пациентам выполнено хирургическое удаление опухоли и проведены стандартные схемы нео- и адъювантной полихимиотерапии. В группу контроля включили 26 практически здоровых людей (14 мужчин, 12 женщин) в возрасте от 13 до 54 лет. Концентрацию ТИМП-1 определяли в образцах сыворотки крови до лечения иммуноферментным методом с помощью реактивов фирмы «*Biosource*» (США), а ММП-2, -7, -9 — фирмы «*R&D*» (США) при использовании автоматического ридера «*Elx 800*» («*Biotek Instruments Inc.*», США). Статистический анализ проводили с помощью программы *Statistica 8* (Statsoft, США). При анализе данных применяли дисперсионный анализ, достоверности различий определяли с использованием непараметрического критерия Mann-Whitney. В настоящей работе все значения маркеров представлены в медианах.

Результаты исследования. ММП-2, ММП-7, ММП-9 и тимп-1 обнаружили в сыворотке крови всех практически здоровых людей и больных первичными опухолями костей. Показано, что медианы ММП-2 в сыворотке крови у практически здоровых людей (196 нг/мл) и больных опухолями костей (160 нг/мл) не различались и не зависели от гистологического строения опухоли. Не выявлено достоверных различий в сывороточных уровнях ММП-7 между больными опухолями костей и контрольной группой. Однако при анализе значений маркера с учетом гистологического строения опухоли достоверные отличия отмечены в уровне ММП-7 между группами больных ГКО (341 нг/мл) и саркомой Юинга (262 нг/мл, $p=0,046$). Обнаружено достоверное повышение содержания ММП-9 в сыворотке крови контрольной группы (501 нг/мл) относительно такового показателя в общей группе больных опухолями костей (377 нг/мл; $p<0,05$). Отмечены достоверные отличия в содержании ММП-9 между группами больных хондросаркомой (311 нг/мл) и периостальной остеосаркомой (552 нг/мл, $p<0,05$). Сывороточные уровни ТИМП-1 не зависели от пола, возраста, локализации и размеров первичных опухолей костей. Медианы ТИМП-1 были достоверно выше при типичной (484 нг/мл, $p<0,038$) и периостальной (609 нг/мл, $p<0,007$) остеосаркомах, чем в контроле (436 нг/мл). Выявлена прямая корреляционная связь между содержанием ТИМП-1 и ММП-9 в сыворотке крови больных типичной и периостальной остеосаркомами, саркомой Юинга. Проведен анализ показателей общей 5-летней выживаемости в наибольшей группе больных остеосаркомой кости с учетом исследованных маркеров. Отмечена тенденция к снижению показателя общей 5-летней выживаемости у больных остеосаркомой с уровнем ММП-2<160 нг/мл (44%), по сравнению с группой пациенток, у которых уровни ММП-2 были >160 нг/мл (71%). При уровне ММП-9<377 нг/мл общая 5-летняя выживаемость больных остеосаркомой была в 1,4 раза выше, чем при значениях ММП-9>377 нг/мл. Минимальные показатели общей 5-летней выживаемости (33%) выявлены в группе больных с сывороточными уровнями ММП-2<160 нг/мл и ММП-9>377 нг/мл.

Заключение. Представленные данные могут служить предметом дальнейших исследований по определению клинической значимости уровней ММП-2, -7, -9 и ТИМП-1 в прогнозе клинического течения различных гистологических вариантов злокачественных опухолей костей.

Литература

1. *Li H., Zhang K., Liu L.H., Li Z.* A systematic review of matrix metalloproteinase 9 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma // Tumour Biol.— 2014.— Vol. 35, № 6.— P. 5487–5491.

2. High serum alkaline phosphatase cooperating with MMP-9 predicts metastasis and poor prognosis in patients with primary osteosarcoma in Southern China / Han J., Yong B., Luo C., Tan P., Peng T., Shen J. // World J. Surg. Oncol.— 2012.— Vol. 10.— P. 37. doi: 10.1186/1477-7819-10-37.

3. Expression of matrix metalloproteinases-2, -8, -13, -26, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in human osteosarcoma / Korpi J. T., Hagström J., Lehtonen N., Parkkinen J., Sorsa T., Salo T., Laitinen M. // Surg. Oncol.— 2011.— Vol. 20, № 1.— P. 18–22.

ХРОМОГРАНИН А В ДИАГНОСТИКЕ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Т. К. Чурикова, М. Г. Томс

Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

biochimia@yandex.ru

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) — гетерогенная группа эпителиальных новообразований из клеток диффузной эндокринной системы, продуцирующих биологически активные соединения, которые могут проявлять себя определенными клиническими синдромами [1]. Среди НЭО желудочно-кишечного тракта большинство новообразований возникает в тонкой кишке (41,8%), прямой кишке (27,4%), аппендиксе (12,2%), реже в желудке (4,1%) и пищеводе (0,06%) [1, 2]. Помощь в диагностике НЭО оказывает определение маркеров в сыворотке крови, и среди них высокомолекулярный кислый белок хромогранин А (ХгА) [3, 4]. Однако данные литературы по диагностической эффективности ХгА неоднозначны, что связано с проблемой стандартизации метода его определения ХгА [5].

Цель настоящего исследования — анализ сывороточных уровней ХгА в диагностике и распространенности НЭО желудочно-кишечного тракта на большой выборке больных с использованием чувствительной, стандартизованной и стабильной тест-системы.

Материалы и методы исследования. В исследование включено 146 больных НЭО желудочно-кишечного тракта (48 мужчин, 98 женщин) в возрасте от 18 до 84 лет: 60 больных НЭО поджелудочной железы (60/41,1%), 33/22,6% — НЭО желудка, 32/21,9% — НЭО тонкой кишки и 21/14,4% — НЭО толстой кишки. Метастазы в печени выявлены у 69,2% пациентов, карциноидный синдром — у 53,4% больных. В группу контроля вошли здоровых 16 мужчин и 50 женщин в возрасте от 17 до 84 лет.

Определение ХгА в плазме крови проводили стандартизованным иммуноферментным методом в плашечном формате при использовании тест-системы «*Chromogranin A ELISA kit*» (*Dako A/S, Denmark*) на основе двух поликлональных антител к С-концевому фрагменту человеческого ХгА с молекулярной массой 23 кДа. Статистический анализ проводили в программе *Statistica 8* (*Statsoft, США*). Для сравнения количественных характеристик в группах применяли дисперсионный анализ, достоверности различий определяли с использованием непараметрического критерия *Mann-Whitney*.

Результаты и их обсуждение. Обнаружено, что уровни ХгА в плазме крови больных НЭО желудочно-кишечного тракта высокодостоверно ($p<0,000001$) превышали соответствующий показатель у практически здоровых мужчин и женщин. В контрольной группе медиана ХгА составила 15,3 Ед/л при вариабельности от 2,8 до 47 Ед/л. Для больных НЭО была характерна выраженная вариабельность ХгА (7,3–102 000 Ед/л). Наиболее высокие медианы ХгА выявлены при НЭО тонкой кишки (183,9 Ед/л), толстой кишки (148,4 Ед/л) и поджелудочной железы (135,9 Ед/л).

Оценку диагностической значимости ХгА проводили с учетом порогового уровня маркера (33 Ед/л), который был рассчитан по результатам определения гликопротеина в контрольной группе и соответствовал среднему значению и двум стандартным отклонениям, что обеспечивало специфичность 98,5%. В общей группе больных НЭО диагностическая чувствительность маркера составила 85,8%, при этом она достигала максимума при НЭО поджелудочной железы (92,8%) и тонкой кишки (87,5%).

Обнаружено, что медиана ХгА (395 Ед/л) при метастатическом поражении печени более 9 раз превышала показатель у пациентов без поражения печени (42 Ед/л; $p<0,0046$). При этом медианы в обеих подгруппах пациентов были достоверно выше по отношению к показателю в контрольной группе мужчин и женщин ($p<0,000001$). Медиана ХгА также была повышена у больных с карциноидным синдромом (352 Ед/л), чем без такового (86 Ед/л; $p<0,000008$). В обеих подгруппах медианы ХгА были достоверно выше, чем в контроле ($p<0,000001$).

Диагностическая чувствительность маркера у больных НЭО с метастатическим поражением печени и проявлениями карциноидного синдрома была максимально высокой (93,6% и 92,9%). У пациентов без соответствующих клинических признаков частота показателей ХгА, превышавших пороговый уровень, была ниже. В то же время достаточно высокая частота гиперсекреции ХгА у пациентов без метастазов в печени (63,2%) и клинических признаков карциноидного синдрома (77,6%) свидетельствует о возможности использования маркера в диагностических целях независимо от распространенности и активности опухолевого процесса.

Заключение. Высокая чувствительность и специфичность ХгА как маркера НЭО желудочно-кишечного тракта способствует повышению эффективности диагностики и оценки распространенности опухолевого процесса.

Литература

1. *Любимова Н. В., Кушлинский Н. Е.* Биохимические маркеры нейроэндокринных опухолей // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.— 2014.— № 1.— С. 1–11.
2. *Oberg K.* Circulating biomarkers in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours // Endocr. Relat. Cancer.— 2011.— Vol. 18 (Suppl 1).— P. 17–25.
3. Chromogranin A: is it a useful marker of neuroendocrine tumors? / Campana D., Nori F., Piscitelli L., Morselli-Labate A. M., Pezzilli R., Corinaldesi R., Tomassetti P. // J. Clin. Oncol.— 2007.— Vol. 25, № 15.— P. 1967–1973.
4. Chromogranin A — biological function and clinical utility in neuroendocrine tumor disease / Modlin I. M., Gustafsson B. I., Moss S. F., Pavel M., Tsolakis A. V., Kidd M. // Ann. Surg. Oncol.— 2010.— Vol. 17, № 9.— P. 2427–2443.
5. Biochemical testing for neuroendocrine tumors / Vinik A. I., Silva M. P., Woltering E. A., Go V. L., Warner R., Caplin M. // Pancreas.— 2009.— Vol. 38, № 8.— P. 876–889.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ПАТОЛОГИИ

СЕКРЕЦИЯ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ММР-9 КЛЕТКАМИ ЭНДОМЕТРИЯ

[1]Н. Е. Волгина, [1]А. А. Садекова, [1]В. С. Щипицына, [1,2]А. М. Красный

[1]Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

[2]Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия

volginadi@gmail.com

Введение. Эндометриоз — заболевание, при котором происходит разрастание ткани железистого эпителия и стромы вне полости матки, сопровождающееся болью в области таза и недостаточностью репродуктивной функции. Согласно последним данным (Международная Ассоциация Эндометриоза), этому заболеванию подвержена каждая 10-я женщина репродуктивного возраста со средним сроком постановки диагноза в 30 лет. Несмотря на большое количество исследований, этиология эндометриоза до сих пор не определена. Теория Сампсона предполагает, что эндометриоз развивается при имплантации и инвазии клеток во время ретроградной менструации в полость малого таза. Имплантация эндометрия сопровождается деградацией внеклеточного матрикса, вызванной секрецией матриксных металлопротеиназ клетками эндометрия [1]. Высвобождение белков из клеток может происходить по пути конститутивной или регулируемой (импульсной, Ca^{2+}-зависимой) секреции [2] с участием нейрональной или гормональной стимуляции. При этом происходит неспецифический экзоцитоз молекул, упакованных в везикулах, находящихся в субмембранном пространстве.

α7-никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChRs) регулируют импульсную секрецию в нервной ткани и хромаффинных клетках [3, 4]. Принимая во внимание, что α7nAChRs были обнаружены в эпителиальных клетках [5], данные рецепторы были выбраны в качестве мишени для исследования механизма секреции ММР-9 в клетках эндометрия. В представленной работе для активации α7nAChRs был использован карбахол, соединение близкое по строению к естественному агонисту ацетилхолиновых рецепторов ацетилхолину.

Цель работы. Сравнить уровень секреции ММР-9 клетками эндометрия у женщин с эндометриозом и без данной патологии при действии карбахола.

Материалы и методы. Сбор материала осуществлялся на базе Научного Центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова Минздрава РФ после подписания пациентками информированного согласия. Исследование секреции ММР-9 было проведено на шести образцах ткани эндометрия у пациенток со II–III стадией развития эндометриоза согласно классификации Американского Общества Акушеров-Гинекологов и шести образцах эндометрия пациенток, проходивших в НЦАГиП плановое лечение по поводу, не связанному с данной патологией. Образцы биопсий эндометрия, взятые на 17–21-й день менструального цикла, помещали в физиологический раствор с добавлением антибиотика и транспортировали в лабораторию. Образцы эндометрия механически измельчали до получения однородных фрагментов и подвергали ферментативной обработке в 0,2%-м растворе коллагеназы IV типа в течение 30 мин при 37° С. Полученные суспензии переносили в 48-луночные планшеты (Corning) в среде DMEM/F12, обогащенной 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Laboratories, Austria). Инкубировали 24 ч при 37° С и 5% CO_2. Количество клеток в лунке планшета варьировало в диапазоне от 200 до 600 тысяч. Постановку твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) осуществляли при помощи набора ММР-9 Human ELISA Kit (Abcam). После часа инкубации клеток эндометрия в 250 мкл HBSS при 37° С, 100 мкл надклеточной жидкости собирали для последующего ИФА. После чего добавляли карбахол в конечной концентрации 100 мкМ. Через три минуты вновь производили забор 100 мкл надклеточной жидкости. Результаты в обеих группах представляют собой разницу между количеством ММР-9 непосредственно до добавления карбахола и через 3 минуты после его внесения и показаны на диаграмме с медианами, 1 и 3 квартилями. Статистическая обработка выполнена с использованием теста Манна-Уитни-Вилкоксона.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали значительные различия в уровне импульсной секреции между эндометриозом и условной нормой. Если при эндометриозе карбахол вызывал стабильную секрецию ММР-9, то в случае нормы в половине проведенных экспериментов при воздействии карбахола на клетки эндометрия секреция не наблюдалась. Было установлено, что средний уровень секреции ММР-9 клетками после внесения карбахола в случае эндометриоза составил 1020 пг на 1000 клеток (925; 185, 1950) и в группе нормы 106 пг на 1000 клеток (95; 0, 220) (рисунок). Уровень секреции в группах достоверно различался $p<0,03$.

Выброс значительного количества ММР-9 во внеклеточное пространство за короткое время (3 мин) предполагает, что этот белок высвобождается из везикул, расположенных в субмембранном пространстве, а не синтезируется *de novo*. В связи с тем, что карбахол близок по строению к естественному агонисту ацетилхолиновых рецепторов ацетилхолину и активирует как мускариновые, так и никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, можно ожидать, что уровень наблюдаемой секреции ММР-9 будет соответствовать физиологическому.

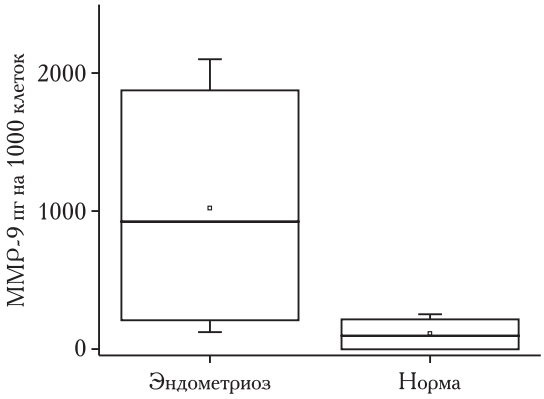


Рисунок. Средний уровень секреции ММР-9 клетками после внесения карбахола. Значимо различались согласно тесту Манна-Уитни-Вилкоксона ($p<0.05$). По 6 образцов (3 нормы равны нулю), сред.— 1020 эндометриоз, 106 — норма.

Заключение. Полученные данные о регулируемой секреции ММР9 клетками эндометрия человека при стимуляции никотиновых ацетилхолиновых рецепторов α7nAChR свидетельствуют об их существенной роли в развитие эндометриоза.

Литература

1. *Burney R. O., Giudice L. C.* Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis // Fertil Steril.— 2012.— Vol. 98. P. 511–519.
2. *Gerber S. H., Südhof T. C.* Molecular determinants of regulated exocytosis // Diabetes.— 2002.— Vol. 51, Suppl. 1.— P. 3–11.
3. *Gotti C., Zoli M., Clementi F.* Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance // Trends Pharmacol. Sci.— 2006.— Vol. 27, № 9. P. 482–491.
4. *Sala F., Nistri A., Criado M.* Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells // Acta Physiol (Oxf).— 2008.— Vol. 192, № 2. P. 203–212.
5. *Dang X., Eliceiri B. P., Baird A., Costantini T. W.* CHRFAM7A: a human-specific α7-nicotinic acetylcholine receptor gene shows differential responsiveness of human intestinal epithelial cells to LPS // FASEB J.— 2015. Vol. 29, № 6.— P. 2292–2302.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ПРОГРЕССИРУЮЩЕМ МАССИВНОМ ФИБРОЗЕ РАБОТНИКОВ УГОЛЬНЫХ ШАХТ

В. П. Волобаев, Е. Э. Калюжная
Кемеровский государственный университет, Россия

kitsuneoni42@gmail.com

Введение. Прогрессирующий массивный фиброз (ПМФ) является тяжелой формой пневмокониоза шахтеров угольных шахт, который характеризуется двусторонними интерстициальными поражениями и эмфиземой легких. Фиброзная ткань замещает нормальные легочные структуры и приводит к развитию дыхательной недостаточности и, как следствие, гипоксии. ПМФ может развиваться и прогрессировать даже после того, как хроническое воздействие угля прекращается. Прогрессирование от простого пневмокониоза до ПМФ напрямую связано со степенью и продолжительностью воздействия пыли, наличием в анамнезе нарушений проходимости дыхательных путей и частоты легочных инфекций [1].

Хроническая экспозиция легочной ткани угольной пылью приводит к развитию воспаления и пролиферации интерстициальных клеток с последующим накоплением коллагена. Цитокины, выпущенные активированными макрофагами, участвуют в привлечении воспалительных клеток в стенки альвеол и альвеолярное пространство. Эти медиаторы воспаления также играют определенную роль в процессах ремоделирования через стимуляцию пролиферации фибробластов и синтеза коллагена. Известно, что полиморфизмы генов провоспалительных цитокинов IL-1b T-511C (rs16944), IL-6 C-174G (rs 1800795), IL-12b A1188C (rs 3212227) и фактора роста эндотелиальных сосудов VEGFA C634G (rs2010963) оказывают влияние на функциональную активность вырабатываемых ферментов или величину их экспрессии, тем самым они должны оказывать модифицирующее влияние на развитие ПМФ [2].

Целью данной работы был поиск генов ассоциированных с риском развития прогрессирующего массивного фиброза.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужила венозная кровь 70 шахтеров мужского пола, работающих на угольных шахтах Кемеровской области и страдающих ПМФ. В группу контроля вошли 80 работников тех же угледобывающих предприятий, но не страдающих профессиональными заболеваниями. Средний возраст в экспериментальной группе составил 49,72±3,26 года, средний стаж работы в условиях угольных шахт — 24,37±4,21 лет. Средний возраст работников угольных шахт, не страдающих профессиональными заболеваниями, составил 51,14±2,37, при среднем стаже 21,63±5,35. Экстракцию ДНК проводили фенол-хлороформным методом. Генотипирование проводили с помощью методики аллель специфичной ПЦР с электрофоретической схемой детекции результатов. Частоту генотипов в группах сравнивали при помощи критерия Стьюдента для выборочной доли, частоту аллелей — критерием χ^2.

Результаты и обсуждение. Для полиморфизма гена IL-6 C-174G выборке больных ПМФ в сравнении с контрольной группой значимо увеличена частота генотипа G/G (43,27±1,98 против 17,76±4,88. χ^2=4,97, df=2, p<0,05). Полиморфизмы генов IL-1b T-511C, IL-12b

A1188C не имели значимых ассоциаций с наличием PMF. Частота генотипа G/G фактора роста эндотелиальных сосудов достоверно была выше у рабочих страдающих ПМФ (28,15±3,18 против 9,66±1,78. χ^2=5,89, df=2, p<0,05), частота генотипа C/C для этой выборки была наоборот снижена (34,42±2,46 против 61,93±4,77. χ^2=6,12, df=2, p<0,05).

Заключение. В результате исследования выявлена ассоциация генотипа G/G полиморфизма гена IL-6 C-174G с наличием ПМФ, что видимо связано с пониженной функциональной способностью полиморфного фермента. Также была выявлена связь полиморфизма гена VEGFA C634G с наличием ПМФ, которую можно объяснить пониженной экспрессией данного цитокина при полиморфном варианте гена.

Литература

1. *Castranova V., Vallyathan V.* Silicosis and coal workers' pneumoconiosis // Environ Health Perspect — 2000.— Suppl. 4.— P. 675–684.
2. Decreased level of vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage fluid of normal smokers and patients with pulmonary fibrosis / Koyama S., Sato E., Haniuda M., Numanami H., Nagai S., Izumi T. // Am J Respir Crit Care Med — 2002.— Vol. 166.— P. 382–385.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ ГИАЛУРОНАНА В КЛОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ОПУХОЛИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ

Н. О. Дашенкова, А. А. Цитрина, А. С. Микаелян

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия

n.goncharova@idbras.ru

Введение. Одной их характеристик раковых клеток является их способность к эпителио-мезенхимному переходу (ЭМП), который сопряжен с ремоделированием внеклеточного матрикса (ВКМ) [1]. В данной работе были рассмотрены белки, регулирующие один из компонентов ВКМ — гиалуроновую кислоту (НА).

Внутриклеточные сигнальные пути, инициируемые взаимодействием НА с рецепторами CD44 и *Rhamm*, приводят к воспалительным и онкогенным реакциям, которые могут способствовать направленной миграции клеток [2].

Has1 и *Has2* синтезируют НА высокой молекулярной массы, наличие которого свидетельствует о нормальных процессах в клетках [3]. При канцерогенезе ремоделирование ВКМ происходит за счет повышения количества молекул НА низкой молекулярной массы, которые образуются путем деградации НА с помощью гиалуронидаз *Hyal1* и *Hyal2* [4].

Существенным фактором для роста и прогрессии рака, возможно, является гетерогенность опухоли, описанная во многих типах рака [5].

Целью данной работы стало исследование экспрессии генов, отвечающих за синтез, деградацию и связывание гиалуронана в клональных клеточных культурах гепатоцеллюлярной карциномы мыши (ГЦК).

Материалы и методы. Из опухолевой ткани ГЦК были выделены 9 клеточных культур, состоящих из эпителиальных клеток полигональной формы с гетерогенностью по степени дифференцировки. Также были получены три клеточные линии методом single cell cloning, две из которых представляли собой более гомогенный пласт клеток, фенотипически похожих на стволовые клетки рака.

После второго пассажа из культур ГЦК выделили тотальный белок и мРНК. Паттерн экспрессии исследуемых генов сравнивали с коммерческой линией клеток гепатомы HEPA1–6 и тканью здоровой печени мыши. Полученные данные обрабатывались статистически в программных обеспечениях StepOne Software v2.3, DataAssist Software v3.01 и GraphPad Prism v5.0. Значения считались достоверными при p<0,05.

Результаты и обсуждение. В большинстве выделенных нами культур ГЦК не обнаружено возрастания экспрессии гиалуронидаз, однако экспрессия *Has2* с наибольшей достоверностью повышена в 4 из 11 культурах (рис. *а*). Значительно повышена экспрессия CD44 и *Rhamm* во всех культурах, что по литературным данным коррелирует со степенью злокачественности опухолевых клеток (рис. *б*) [5]. Наличие белка CD44 в выделенных культурах ГЦК было показано иммунохимическим окрашиванием. Маркер ГЦК — белок α-фетопротеин — детектировался во всех исследуемых образцах методом Вестерн-блот.

Заключение. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой злокачественности полученных популяций клеток и их возможности к эпигенетической пластичности в исходной опухоли. Анализ экспрессии генов, участвующих в регуляции гиалуронана в клональных клеточных культурах ГЦК, может указывать на паракринное влияние клеточных популяция друг на друга в одной опухоли, а также на способность регулировать состав ВКМ для создания благоприятной среды для опухолевого роста, инвазии и метастазирования.

Работа поддержана РФФИ (№ 16-34-00769).

Литература

1. Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment / Jing Y., Han Z., Zhang S., Liu Y., Wei L. // Cell & Bioscience.— 2011.— Vol. 1.— P. 29.

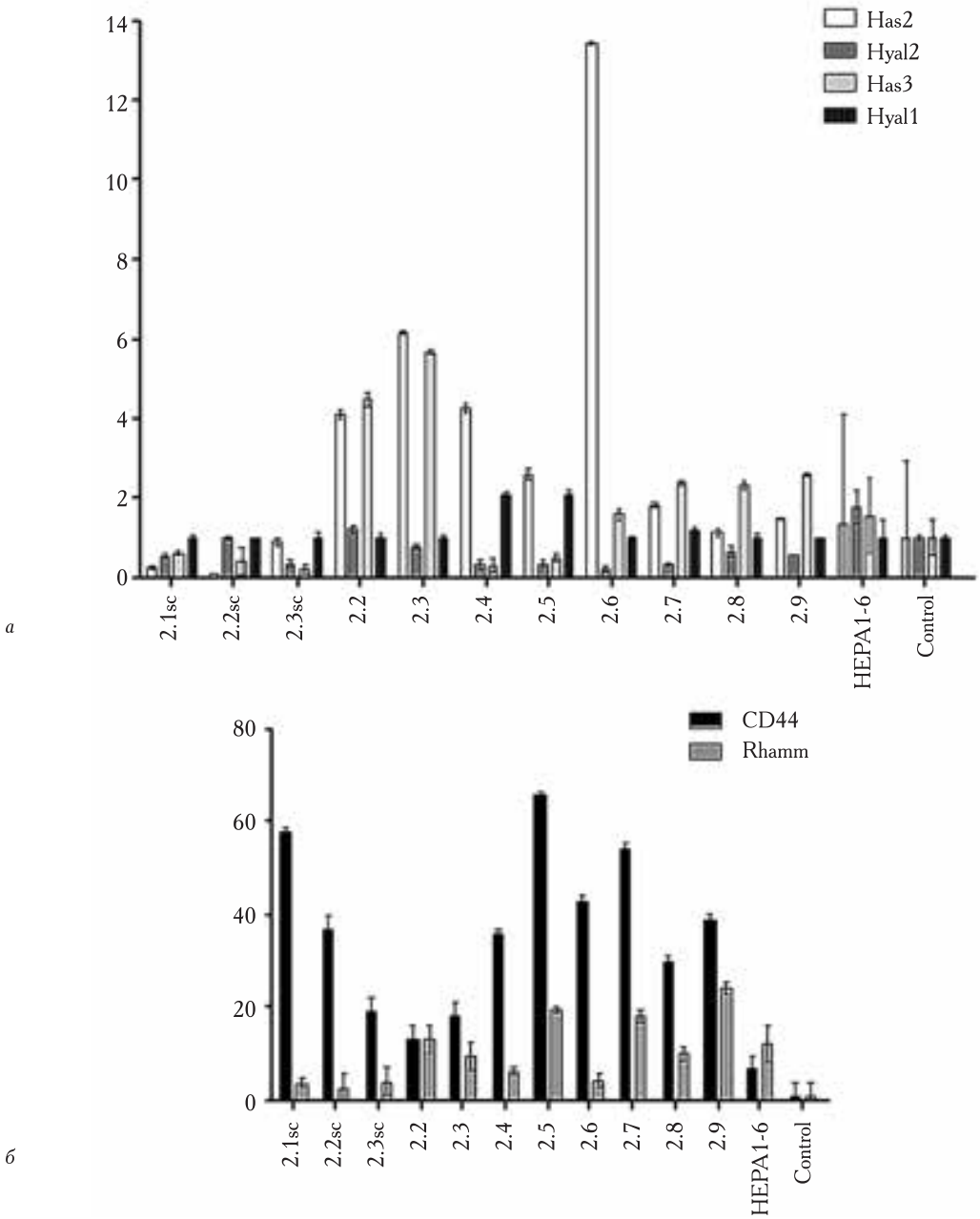


Рисунок. Относительная экспрессия мРНК генов: *а* — гиалуронан синтетаз (*Has2*, *Has3*) и гиалуронидаз (*Hyal1*, *Hyal2*); *б* — рецепторов гиалуронана (CD44 и *Rhamm*).

2. Hyaluronan, Inflammation, and Breast Cancer Progression / Schwertfeger K., Cowman M., Telmer P., Turley E., McCarthy J. // Front Immunol.— 2015.— Vol. 6.— P. 236.
3. *Maharjan A., Pilling D., Gomer R.* High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Regulate Human Fibrocyte Differentiation // PLoS One.— 2011.— Vol. 6.
4. A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis / Wu M., Cao M., He Y., Liu Y., Yang C., Du Y., Wang W., Gao F. // FASEB J.— 2015.— Vol. 29.— P. 1290–1298.
5. Expression of cancer stem cell biomarkers as a tool for a correct therapeutic approach to hepatocellular carcinoma / Romano M., De Francesco F., Pirozzi G., Gringeri E., Boetto R., Di Domenico M., Zavan B., Ferraro G., Cillo U.// Oncoscience.— 2015.— Vol. 2.— P. 443–456.

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ (*CAT*, *SOD1*, *SOD2*), И СКЕЛЕТНЫЙ ФЛЮОРОЗ РАБОТНИКОВ АЛЮМИНИЕВОЙ ПРОМЫШЛЕНОСТИ

Е. Э. Калюжная, В. П. Волобаев
Кемеровский государственный университет, Россия

Ekaterina.Eduardovna@yandex.ru

Введение. В числе задач современной медико-биологической науки одной из приоритетных является изучение воздействия экологических факторов на организм человека. Повседневное существование значительной доли населения планеты связано с систематическим контактом с неблагоприятными факторами окружающей среды, многие из которых способны вызывать физиологические нарушения или инициировать патологические процессы. К таким факторам относится и чрезмерное поступление в организм фторидов. Фториды, при дозах, превышающих допустимые концентрации, способны вызывать нарушение функций организма. Хроническое экспонирование малыми дозами фторидов приводит к развитию эндемичного (зубного) флюороза, а поступление в организм больших доз фтористых соединений вызывает развитие фтористой интоксикации (скелетного флюороза). Фтористую интоксикацию принято считать профессиональным заболеванием работников предприятий алюминиевого производства, в связи с подавляющей их долей в структуре распространения скелетного флюороза, но встречаются и единичные случаи заболевания в других отраслях промышленности, например, в ракетостроительной. Установлено, что, в первую очередь, фтор, как сильнейший окислитель, воздействует на клеточные мембраны, вызывая нарушение трансмембранного транспорта и функционирования мембранных рецепторов. Кроме того, фтористая интоксикация приводит к окислению мембранных фосфолипидов опосредованно через нарушение системы перекисного окисления [1]. Таким образом, деструктивное воздействие фтора во многом определяется нативным состоянием антиоксидантной системы, что придает актуальность изысканиям, направленным на выявление связи полиморфизма генов, кодирующих ферменты антиоксидантной системы, с наличием патологических изменений в организме рабочих, постоянно контактирующих с агрессивными фтористыми соединениями.

Цель исследования: поиск генов, ассоциированных с риском развития скелетного флюороза.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужила периферическая кровь 130 работников алюминиевого производства города Новокузнецк, страдающих хронической фтористой интоксикацией. Средний стаж работы во вредных условиях составил 18,16±1,73 года. В контрольную группу вошли 80 здоровых рабочих того же производства, со средним стажем работы 16,63±1,29 года. Экстракцию ДНК проводили фенол-хлороформным методом. Генотипирование проводили аллель специфичной ПЦР с электрофоретической детекцией результатов. В ходе исследования выявлялось наличие полиморфизмов генов, кодирующих каталазу (CAT C-267T), супероксиддисмутазу первого типа (SOD1 G7958A) и супероксиддисмутазу второго типа (SOD2 Ala16Val). Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ «Statistica 8.0», пользуясь критерием хи-квадрат.

Результаты. Установлена ассоциация полиморфизма гена CAT C-267T с наличием профессионального флюороза, в выборке страдающих патологией, по сравнению с контрольной группой, доминировала частота генотипа T/T 11,96% против 3,03% (χ^2=4,86 при df=2, p<0,05).

Ассоциации между наличием фтористой интоксикации и генотипом супероксиддисмутазы первого и второго типа выявлено не было. Частоты встречаемости аллелей так же не показали, какой-либо зависимости между данными полиморфизмами и флюорозом.

Заключение. Таким образом, выявлено, что генотип T/T полиморфизма гена CAT C-267T, характеризующийся снижением активности фермента [2], является фактором риска для развития скелетного флюороза.

Литература

1. *Цебржинский О. И.* Влияние фторида натрия на процессы сбободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма животных и человека. Автореф. дис. … канд. биол. наук (03.00.13).— Симферополь, 1992.
2. Polymorphisms in the promoter region of catalase gene and essential hypertension / Zhou X. F., Cui J., De Stefano A. L., Chazaro I., Farrer L. A., Manolis A. J. // Dis Markers.— 2005.— Vol. 21.— P. 3–7.

НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВ У БОЛЬНЫХ ЭПИЛЕПСИЕЙ

[1]Т. В. Капустина, [2]Ж. И. Савинцева, [1]М. В. Иванов, [1]Л. В. Липатова
[1]Санкт-Петербургский научно-исследовательский психоневрологический институт им. В.М. Бехтерева Министерства здравоохранения РФ, Россия
[2]Институт мозга человека РАН им. Н. П. Бехтеревой, Санкт-Петербург, Россия

epilepsy-net@ya.ru

Распространенность депрессии при эпилепсии варьирует от 3–9%, у больных с медикаментозной ремиссией [1], до 20–55% — у больных с плохо контролируемой эпилепсией. В ряде исследований, изучающих распространенность депрессивных расстройств у пациентов с различными заболеваниями, частота депрессии при эпилепсии была достоверно выше, чем при других нозологиях [2]. Эмоциональные нарушения являются основной проблемой при височной форме эпилепсии. По-видимому, это объясняется тем, что височные доли или лимбические структуры являются ответственными за эмоции и копинг, также как и кора ответственны за когнитивное функционирование [3]. Некоторые исследователи объясняют появление таких расстройств у больных эпилепсией, по большей части, за счет лимбической дисфункции. Так в частности было показано, что депрессия связана со структурными изменениями в гиппокампе, префронтальной коре, миндалине, передней части поясной извилины и базальных ганглиях. Уменьшение объема гиппокампа может быть вызвано гибелью нейронов, модификацией нейрональных и глиальных клеток, снижением нейрогенеза, что объясняют низким уровнем нейротрофинов, в частности нейротрофического фактора мозга [4]. Таким образом, анализ современных литературных данных позволил ученым прийти к выводу, что в основе прогрессивных структурных изменений ряда областей головного мозга при эпилепсии и депрессии предположительно лежат процессы, связанные с воспалением, нейродегенерацией.

Цель исследования — изучить структурно-морфологические особенности головного мозга у больных эпилепсией (БЭ) и депрессией.

Материалы и методы. Обследовано 45 БЭ и депрессией, 20 мужчин и 25 женщин, средний возраст составил 34±4,2 года. Всем больным была проведена диффузно-тензорная 3Т МРТ головного мозга по специально разработанному протоколу с прицельным исследованием гиппокампа и использованием методов «тонкой» структурной нейровизуализации (трактографии), клинико-психологическое исследование (осмотр невролога, психиатра, психолога с использованием батареи нейропсихологических шкал, ЭЭГ. В качестве контрольной группы были обследованы 30 здоровых добровольцев, сопоставимых по гендерному и возрастному составу с БЭ.

Результаты и обсуждение. Тоскливые депрессии и субдепресии выявлены у 10 БЭ (22,2% от всех обследованных больных), адинамические депрессии и субдепрессии — у 15 (33,3%), ипохондрические депрессии и субдепрессии — у 10 пациентов (22,2%), тревожные депрессии и субдепрессии — у 10 (22,2%).

У всех пациентов выявлены МРТ-изменения в структурах, входящих в состав кортико-стрио-таламо-кортикальных нервных кругов, дисфункция которых, по мнению многих современных авторов, играет ведущую роль в патогенезе депрессий. У больных с депрессивными состояниями каждой группы выявлялись характерные структурные изменения в виде снижения плотности серого вещества и фракционной анизотропии в различных отделах головного мозга. У БЭ и тоскливыми депрессиями и субдепресиями определялось снижение плотности серого вещества в переднем отделе левой поясной извилины зрительной коре с билатерально — в орбитофронтальных и нижневисочных корковых отделах, а также в передневентральных отделах таламусов билатеральное снижение фракционной анизотропии в трактах задних отделов поясных извилин, более выраженное слева, а также в стволе мозолистого тела и форникса. В группе БЭ и адинамическими депрессиями выявлено снижение плотности вещества мозга в головках хвостатых ядер, парагиппокампальном отделе слева правом миндалике мозжечка и зрительной коре слева, а также дорсолатеральных и передних отделах таламусов; снижение фракционной анизотропии определялось билатерально в проводящих путях задних и переднецингулярных отделов, больших и малых щипцов (в трактах, обеспечивающих межполушарную связь), колене, стволе и валике мозолистого тела, форниксе, правом нижнем лобно-затылочном пучке, а также кортико-спинальном тракте. У БЭ и ипохондрическими депрессиямии выявлено снижение плотности серого вещества в орбитофронтальных корковых отделах слева, билатерально — в коре субмозолистых извилин и инсулярных отделах, в области головки правого хвостатого ядра, а также передних отделах таламусов, зрительной коре слева. Дефицит трактов выявлен в колене мозолистого тела, форниксе, нижнем лобно-затылочном пучке справа. В группе с тревожными депрессиями определялось снижение плотности серого вещества в орбитофронтальных корковых отделах слева, билатерально — в коре субмозолистых извилин и инсулярных отделах, в области головки правого хвостатого ядра, а также в дорсомедиальных и передних отделах таламусов. Кроме того, были выявлены изменения в правом миндалике мозжечка и зрительной коре справа.

Выводы. Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что в патогенезе депрессивных расстройств у БЭ важную роль играют нейродегенеративные процессы в области подкорковых структур головного мозга, деафферентация этих отделов с орбитофронтальными отделами коры головного мозга и мозжечка, осуществляющих регуляцию тормозных нейромедиаторных процессов.

Литература

1. *Letterman L., Markowitz J. S.* Gabapentin: a review of publishedexperience in the treatment of bipolar disorder and other psychiatricconditions // Pharmacotherapy.— 1999.— Vol. 99.— P. 565–72.
2. *Kessler R. C., Berglund P. A., Demler O., Jin R., Walters E. E.* Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R) under review. [PubMed]
3. *Kimiskidis Vasilios K. et al.* Depression and anxiety in epilepsy: the association with demographic and seizure-related variables // Annals of General Psychiatry.— 2007.— Vol. 6. P. 28.
4. *Schmitz B.* Psychiatrische Symptome bei Epilepsie: welschen Effekth aben Antiepileptika? Novo Nordisk Satelliten Symposium, Deutsche Ligagegen Epilepsie, Handout: Tiagabin: Einweiterer Schritt in der Kunstzuhelfen, 1996; P. 24–27.

ЭКСПЕРССИЯ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В КЛЕТКАХ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВЫХ СУДОРОГ ЗАВИСИТ ОТ ИХ ДЛИТЕЛЬНОСТИ

[3]А. А. Коваленко, [2]С. В. Калеменев, [1]А. П. Шварц, [1,2]О. Е. Зубарева
[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[2]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия
[3]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

kovalenko_0911@mail.ru

Введение. Эпилепсия является одним из самых распространенных заболеваний центральной нервной системы. Частота данной патологии достигает 0,5–0,75%, а среди детского населения — до 1% населения. Особого внимания эпилепсия требует в детском и подростковом возрасте, так как может приводить к нарушению нормального развития мозга и значительным расстройствам когнитивных функций, что было показано в клинике [1] и эксперименте [2]. Сложность лечения эпилепсии объясняется ее гетерогенным характером и разнообразием патогенетических механизмов, которые не до конца изучены. В последние годы активно обсуждается роль процессов нейровоспаления и его медиаторов,— провоспалительных цитокинов в патогенезе эпилепсии и постсудорожных нервно-психических расстройств [3, 4]. В частности, показано, что при судорогах усиливается синтез провоспалительных цитокинов интерлейкина-1β (ИЛ-1β) и фактора некроза опухоли α (ФНОα) в клетках мозга, что может приводить к изменению возбудимости нейронов и даже их гибели [5, 6]. Однако вопрос о том, могут ли перенесенные судорожные состояния приводить к долговременным изменениям продукции этих провоспалительных цитокинов в клетках мозга, остается открытым.

Цель исследования: изучение особенностей экспрессии генов провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНОα в клетках медиальной префронтальной коры, вентрального и дорзального гиппокампа крыс через неделю после пилокарпин-индуцированных судорог различной длительности.

Объекты, материалы и методы. Работа выполнена на неполовозрелых самцах крыс Вистар. Использована литий-пилокарпинововая модель височной эпилепсии. Судороги индуцировали у животных в возрасте 6 нед. За сутки до введения пилокарпина (Sigma; 30 мг/кг, в/б) крысам (n=22) вводили LiCl (Sigma; 127 мг/кг, в/б), а за 1 ч — метилскополамин (Sigma; 1 мг/кг, в/б) для предотвращения избыточной активации периферических мускариновых рецепторов. Контрольным животным (n=6) в те же сроки вводили физиологический раствор. Для регистрации индивидуальной реакции на инъекции пилокарпина животных рассаживали в клетки с прозрачными стенками и производили видеосъемку в течение 3 ч. На основе анализа видеозаписей выделяли группу животных с короткими судорогами (до 130 мин включительно; n=10) и длительными судорогами (180 мин и более; n=9). Забор мозга для анализа производили через неделю после судорог. Мозг замораживали и хранили при температуре −70° С. Выделение медиальной префронтальной коры, вентрального и дорзального гиппокампа производили на срезах, выполненных с помощью замораживающего микротома. Экспрессию генов ИЛ-1β и ФНОα оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Полученные результаты нормировали по данным, полученным для гена «домашнего хозяйства»,— циклофилина А.

Результаты и их обсуждение. Показано, что в дорзальном и вентральном гиппокампе, но не медиальной префронтальной коре, введение пилокарпина приводило через неделю после инъекций к усилению продукции мРНК ИЛ-1β, которое зависело от длительности перенесенных судорог (дорзальный гиппокамп: F=4,19; p=0,04; вентральный гиппокамп: F=4,04; p=0,045). В дорзальном гиппокампе уровень экспрессии гена ИЛ-1β у крыс с длительными, но не с короткими судорогами также значимо отличался от контроля по апостериорному критерию Геймса–Хоуэлла (p=0,036). В отношении мРНК ФНОα достоверных различий между группами не было выявлено.

Заключение. Проведенное исследование показало, что длительные, но не кратковременные судороги приводят к усилению экспрессии гена ИЛ-1β в клетках гиппокампа. Вопрос, являются эти изменения долговременны-

ми или отсроченными, требует отдельного изучения. Использование противовоспалительных цитокинов, подавляющих синтез ИЛ-1β, (ИЛ-10 и др.), либо конкурирующих с ним за рецепторы (рецепторный антагонист ИЛ-1), представляется перспективным для разработки новых стратегий постсудорожных нарушений гиппокамп-зависимых форм поведения.

Литература

1. *Троицкая Л. А., Воронкова К. В.* Нарушение памяти у детей с парциальными формами эпилепсии // Неврол журн.— 2001.— № 1.— С. 18–21.
2. Нарушения исследовательского поведения и пространственной памяти у крыс пубертатного возраста при использовании литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии / Калеменев С. В., Зубарева О. Е., Фролова Е. В., Сизов В. В., Лаврентьева В. В., Лукомская Н. Я., Ким К. Х., Зайцев А. В., Магазаник Л. Г. // Докл. АН.— 2015.— Т. 463, № 3.— С. 365–367.
3. *Dupuis N., Auvin S.* Inflammation and epilepsy in the developing brain: clinical and experimental evidence // CNS Neurosci. Ther.— 2015.— Vol. 21, № 2.— P. 141–151.
4. *Vezzani A., Viviani B.* Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability // Neuropharmacology.— 2015.— Vol. 96.— P. 70–82.
5. Interleukin-1β, seizures and neuronal cell death / Medel-Matus J. S., Cortijo-Palacios L. X., Álvarez-Croda D. M., Martínez-Quiroz J., López-Meraz M. L. // Rev. Peru. Med. Exp. Salud. Publica.— 2013.— Vol. 30, № 2.— P. 262–267.
6. Iori V., Frigerio F., Vezzani A. Modulation of neuronal excitability by immune mediators in epilepsy // Curr. Opin. Pharmacol.— 2016.— Vol. 26.— P. 118–123.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ НАРУШЕНИЯ СТЕРОИДОГЕНЕЗА И ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ, В ГЕНАХ ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ NR0B1 И NR5A1

[1]А. С. Орехова, [2]Н. Ю. Калинченко, [2]А. Н. Тюльпаков, [1]П. М. Рубцов

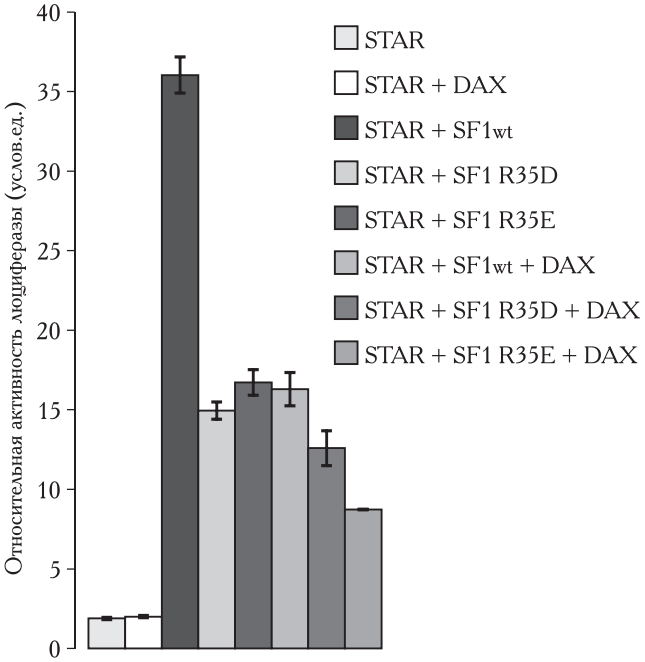
[1]Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

[2]Эндокринологический научный центр Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

anna.s.orekhova@gmail.com

Введение. Представители суперсемейства ядерных рецепторов NR0B1 (DAX1, DSS -AHC, dosage sensitive sex reversal–adrenal hypoplasia congenital critical region on chromosome X, gene 1) и NR5A1 (SF-1, стероидогенный фактор-1) играют важную роль в развитии надпочечников и гонад и регуляции стероидогенеза. Мутации в гене DAX1 вызывают Х-сцепленную врожденную гипоплазию надпочечников [1], а мутации в гене SF-1 приводят к дисгенезии гонад, в некоторых случаях в сочетании с надпочечниковой недостаточностью [2, 3]. Белок SF-1 является активатором транскрипции многих генов стероидогенеза, а DAX1 действует как репрессор SF-1-зависимой транскрипции [4–6]. **Цель настоящей работы** — функциональная характеристика мутаций в генах DAX1 и SF-1, выявленных у пациентов с соответствующими эндокринными нарушениями.

Материалы и методы исследования. Для оценки функциональной активности мутантных вариантов SF-1 и DAX1 использовали систему экспрессии в клетках млекопитающих репортерного гена люциферазы под контролем промотора гена StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein), который активируется под действием SF-1. Для конструирования мутантных вариантов DAX1 и SF-1 использовали метод двухраундовой ПЦР с мутагенными праймерами. Фрагменты, кодирующие мутантные белки встраивали в вектор pcDNA-3.1(+) и полученными конструкциями трансфицировали клетки эмбриональной почки человека HEK293. В лизатах трансфицированных клетках определяли ферментативную активность люциферазы. Для определения влияния мутаций в гене SF-1 на сплайсинг сконструировали минигены SF1, состоящие из части экзона 2, интрона 2 и части экзона 3, гена дикого типа и мутантных генов. Минигены экспрессировали в клетках HEK293 и анализировали продукты сплайсинга.



Результаты и их обсуждение. Сконструированы векторы для экспрессии в клетках млекопитающих DAX1

Таблица

Анализ влияния мутантных вариантов DAX1 и SF-1 на активность промотора гена StAR в системе экспрессии репортерного гена люциферазы в клетках HEK293

Плазмиды, использованные для трансфекции клеток HEK293 в комбинации с репортерной плазмидой pGL3-StAR-prom, содержащей ген люциферазы светлячка под контролем промотора гена StAR	Относительная активность люциферазы (среднее значение ± стандартное отклонение)
pcDNA3.1	1
pcDNA3.1 + pcDNA3.1/SF-1	11,82±2,05
pcDNA3.1 + pcDNA3.1/SF-1+pcDNA3.1/DAXwt	4,79±0,77
pcDNA3.1 + pcDNA3.1/SF-1+pcDNA3.1/DAX-L262R	11,76±2,32
pcDNA3.1 + pcDNA3.1/SF-1+pcDNA3.1/DAX-L295R	14,30±3,93
pcDNA3.1 + pcDNA3.1/SF-1+pcDNA3.1/DAX-Y380X	7,18±1,23
pcDNA3.1 + pcDNA3.1/SF-1+pcDNA3.1/DAX-L386H	10,70±3,40
pcDNA3.1 + pcDNA3.1/SF-1+pcDNA3.1/DAX-X471K	7,47±1,49
pcDNA3.1	1
pcDNA3.1 + pcDNA3.1/SF-1	19,17±0,04
pcDNA3.1 + pcDNA3.1/SF-1-R35D	7,95±0,29
pcDNA3.1 + pcDNA3.1/SF-1-R35E	8,89±0,43

дикого типа и пяти мутантных вариантов (L262R, L295R, Y380X, L386H и X471K), обнаруженных у больных с врожденной гипоплазией надпочечников. Установлено, что все пять мутантных вариантов подавляют SF-1-зависимую активность промотора StAR в меньшей степени, чем DAX1 дикого типа (таблица), что коррелирует с результатами клинических исследований.

Идентифицирована новая мутация GGC->GAC (R35D) в гене SF-1, приводящая к дисгенезии гонад и надпочечниковой недостаточности. Она затрагивает тот же кодон, что и классическая мутация GGC->GAA (R35E), описанная в работе [2]. Аминокислотный остаток R35 расположен в 1-м цинковом пальце белка SF-1 и его замена на другие аминокислоты влияет на ДНК-связывающую активность SF-1. Обе мутации сильно снижают транскрипционную активность SF-1 (таблица). Замены нуклеотидов GGC>GAA и GGC>GAC расположены в начале экзона 3 гена SF-1 и соседствуют с интрон-экзонной границей, поэтому мы проверили также влияние этих замен на сплайсинг. Анализ продуктов сплайсинга после трансфекции клеток HEK293 не выявил различий в характере сплайсинга минигена дикого типа и мутантных минигенов.

Выводы. Результаты функционального анализа мутаций в генах DAX1 и SF-1, полученные с использованием системы экспрессии репортерного гена люциферазы в культивируемых клетках HEK293, хорошо соответствуют клиническим данным.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-04-04395).

Литература

1. *Zanaria E., Muscatelli F., Bardoni B. et al.* An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenital // Nature.— 1994.— Vol. 372.— P. 635–641.
2. *Achermann J. C., Ito M., Hindmarsh P. C., Jameson J. L.* A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans // Nature Genetics.— 1999.— Vol. 22.— P. 125–126.
3. *Köhler B., Lin L., Ferraz-de-Souza B., Wieacker P.et al.* Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency // Hum. Mutat. — 2008.— Vol. 29, № 1.— P. 59–64.
4. *Lin L., Gu W. X., Ozisik G. et al.* Analysis of DAX1(NR0B1) and steroidogenic factor-1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) in children and adults with primary adrenal failure: Ten years' experience // J. Clin. Endocrinol. Metab.— 2006.— Vol. 91.— P. 3048–3054.
5. *Орехова А. С., Рубцов П. М.* DAX1 — необычный представитель суперсемейства ядерных рецепторов с разнообразными функциями // Молекулярная биология.— 2015.— Т. 49, № 1.— С. 75–88.
6. *Тюльпаков А. Н., Калинченко Н. Ю.* Клиническая и молекулярно-генетическая характеристика 10 случаев врожденной гипоплазии надпочечников, обусловленной дефектами фактора DAX1 // Проблемы эндокринологии.— 2010.— № 2.— С. 3–7.

М-КАЛЬПАИН КАК ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ПРОТЕАЗА

Н. С. Пестерева, И. С. Обламская, М. Н. Карпенко
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

pesterevans@yandex.ru

В последнее десятилетие ограниченный протеолиз белков и пептидов рассматривают как особую форму физиологической регуляции и считают универсальным механизмом, ответственным за образование и модификацию ферментов. На сегодня показано, что реакции ограниченного протеолиза лежат в основе функционирования важнейших физиологических систем, в частности, ренин-ангиотензиновой, калликреин-кининовой, иммунитета, гемостаза, комплемента, апоптоза, регуляции экспрессии генов [1]. Поэтому для понимания принципов регуляции физиологических систем необходимо детальное изучение внутриклеточных регуляторных протеаз и тех реакций, которые они катализируют. Среди внутриклеточных протеолитических систем особого внимания заслуживают те из них, которые активируются в ответ на увеличение в клетке концентрации ионов кальция — ключевого посредника множества клеточных реакций. Известно, что при развитии ряда патологических процессов существует опасность чрезмерной активации кальций-зависимых протеолитических систем вследствие нарушения гомеостаза ионов кальция, вызванного, в частности, экзайтотоксическим действием глутамата, аномально высокой проводимостью кальциевых каналов [2]. С этой точки зрения особый интерес вызывает Ca^{2+}-зависимая кальпаиновая система. Кальпаины — это семейство внутриклеточных цистеиновых кальций-зависимых протеаз, имеющих максимальную протеолитическую активность при нейтральных значениях pH. Физиологические функции кальпаинов полностью обусловлены их протеолитической активностью. Субстратами кальпаинов являются: рецепторы, киназы, фосфатазы, белки цитоскелета и синаптосомальны белки. Некоторые из них расщепляются до аминокислот, хотя большинство подвергается ограниченному протеолизу, что приводит к изменению функциональной активности белков, появлению у них новых свойств. Кальпаины принимают участие в регуляции многих физиологических функций, в том числе в модуляции синаптической передачи. Благодаря своей способности к ограниченному протеолизу белков и пептидов, кальпаины вовлечены в процессы синтеза, упаковки, высвобождения и обратного захвата некоторых нейромедиаторов, а также способны модифицировать рецепторы к ним. При некоторых формах патологии ЦНС наблюдается неконтролируемая гиперактивация кальпаинов, приводящая к срыву регуляции нейромедиаторной передачи, что может, в свою очередь, стать дополнительным фактором, интенсифицирующим развитие нейродегенеративного процесса. Считается, что локализация кальпаинов исключительно внутриклеточная, но субклеточное распределение м- и μ-кальпаинов различаются. В ряде работ показано, что локализация зависит от типа клеток и от их функционального состояния. В нейронах μ-кальпаин был обнаружен в дендритах и теле клетки, а м-кальпаин — в аксонах. В клетках микроглии обнаруживается μ-кальпаин, причем считается, что в этих клетках он выполняет сигнальную функцию [3]. Хочется отметить, что в большинстве клеток кальпаины находятся и вблизи плазматической мембраны, мембран органелл, а также в рафтах — детергент-устойчивых сигнальных доменах, а не только в цитоплазме. К тому же, локализация кальпаинов может меняться в зависимости от концентрации кальция внутри клетки. В последнее десятилетие появились работы, в которых показано наличие кальпаина во внеклеточном пространстве, в частности, в различных биологических жидкостях человека (сыворотка крови, ликвор, синовиальная жидкость). Однако механизм высвобождения кальпаина клетками до сих пор не изучен.

В связи с этим, целью нашего исследования было выявить способность кальпаина высвобождаться/секретироваться во внеклеточную среду. Эксперименты выполнены на модели выделенных нервных окончаний — синаптосом. Синаптосомы выделяли из стриатумов лабораторных крыс и инкубировали в присутствии 1 мМ ЭДТА (кальпаины инактивированы) и 1 мМ $CaCl_2$ (полная активация кальпаинов). После инкубации образцы центрифугировались, из супернатанта преципитировали кальпаины. Оказалось, что при инкубации синаптосом в присутствии ионов кальция преципитат содержит м-кальпаин. В аналогичном опыте методом казеинолиза в растворе нами было показано, что внесинаптосомальный кальпаин сохраняет свою протеолитическую активность, причем, при увеличении содержания ионов кальция в буферном растворе (во время инкубации синаптосом), уровень внесинаптосомального кальпаина увеличивается. Таким образом, нами была выявлена доза-зависимая (от содержания ионов кальция в среде) способность м-кальпаина высвобождаться/секретироваться синаптосомами. Также нами была показана прямая зависимость между временем инкубации синаптосом в буфере Рингера-Кребса в присутствии $CaCl_2$ и уровнем внесинаптосомального кальпаина.

Проведенные в данном исследовании эксперименты подтверждают способность нервных клеток высвобождать кальпаин [4]. Действительно, на модели выделенных нервных окончаний — синаптосом — нами было продемонстрировано, что добавление в буфер Рингера-Кребса (не содержащего ионов кальция) 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ и 3 мМ $CaCl_2$ приводит к доза-зависимому высвобождению кальпаина во внесинаптосомальную среду, при этом уровень внеклеточного кальпаина повышается и при увеличении длительности инкубации (при 37° С) синаптосом в буфере Рингера-Кребса с добавлением $CaCl_2$. В отсутствии ионов кальция в среде (к буферу Рингера-Кребса добавляли 1 мМ ЭДТА) высвобождение кальпаина не происходило.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00587.

Литература

1. *Соловьева Н. И., Елисеева Ю. А., Локшина Л. А.* Протеолитические ферменты и их биологические функции. Вестник РАМН № 2, 3–9, 1995.
2. *Lajtha F., Banik N. L.* Role of proteases in the pathophysiology of neurodegenerative diseases.— New-York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, 2002.
3. Reactive microgliosis: extracellular μ-calpain and microglia-mediated dopaminergic neurotoxicity / Levesque S., Wilson B., Gregoria V., Thorpe L. B., Dallas S., Polikov V. S., Hong J.-S., Block M. S. // Brain.— 2010.— Vol. 133 (3). P. 808–821.
4. *Карпенко М. Н., Пестерева Н. С., Обламская И. С., Щукина В. А.* Нейрокомпьютеры: разработка, применение.— СПб.: Изд-во «Радиотехника», 2016.— № 2.— С. 44–47.

ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТА ОРЕКСИНА OX1R SB-408124 НА СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА И НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОЛОВЫХ КЛЕТКАХ САМЦОВ КРЫС

А. В. Семёнова, Г. П. Косякова

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Россия

galkos1@mail.ru

Введение. В данной работе мы изучали изменения, произошедшие с клетками после введения животному антагониста орексина OX1R SB-408124 в дозе 200 мкг в 20 мкл интраназально однократно; многократно ежедневно в течение 7 дней; в фазе реабилитации через 14 дней после введения. Исследовали пролиферативную активность сперматоцитов крыс под влиянием OX1R SB-408124, определяли интерфазные ядрышкообразующие районы хромосом (ИЯОР), микроядра (МЯ) и анафазные мосты (АМ) в клетках семенников у белых крыс линии Wistar, подвергавшихся введению OX1R SB-408124 по сравнению с контрольной группой, которым вводили физ. раствор.

Материалы и методы. Частоту встречаемости сперматоцитов с МЯ и АМ находили на «кляч»-препаратах семенников [1] под иммерсией при увеличении об. ×100, ок. ×10 на микроскопе «OlympusVanox-T» с зеленым светофильтром на (λ=440 мкм). На предметные стекла наносили мазки семенников, их высушивали, фиксировали 96%-м C_2H_5OH, окрашивали по Романовскому — Гимзе или флуорохромом DAPI. Частоты встречаемости сперматоцитов с МЯ и АМ отыскивали в выборках из 500 клеток и выражали в %. Не учитывались малые и расположенные на периферии клетки. Для идентификации клеток семенников, погибающих в результате апоптоза, применялся метод микроскопического анализа с окрашиванием акридиновым оранжевым. Семенники измельчали в физ. р-ре, пипетировали и фильтровали. Затем помещали каплю суспензии клеток на предметное стекло, добавляли 1–2 мл р-ра акридинового оранжевого (6 мкг/мл) и 0,2 М-й раствор Na_2HPO_4 (pH=7,2), анализировали на микроскопе «OlympusVanox-T» с флуоресцентной насадкой при увеличении ×1000 с использованием зеленого светофильтра (λ=495–515 нм). Анализировали не менее 1000 клеток от каждой особи. Препараты для выявления фибриллярных центров (ФЦ), фиксировали смесью ледяной CH_3COOH и C_2H_5OH (1:3) в течение 15 минут, споласкивали дистиллятом, высушивали, серебрили, докрашивали красителем Романовского — Гимзы, подсушивали, анализировали на микроскопе «OlympusVanox-T» при увеличении ×1000 под иммерсией. Рассчитывали количество ФЦ в 100 клетках. Анализировались клетки с ядрами правильной формы и с ядрами нерегулярной формы. Статистическую обработку проводили по t-критерию Стъюдента.

Результат и обсуждение. Предположительно, изменение активности генов рРНК может косвенно свидетельствовать о воздействии OX1R SB-408124 на половые клетки. Из данных очевидно незначительное понижение количества ядрышек на одну клетку во всех группах крыс, кроме стадии реабилитации при стандартном значении по t-критерию Стъюдента. В контроле значение этого показателя составило 1,20±0,09. Число ФЦ на клетку составило в контроле — 5,68±0,36 в острой фазе. В подострой фазе 4,87±0,29, и в фазе реабилитации в сперматоцитах выявилось понижение индекса ФЦ при $p<0,01$ по отношению к контролю (где контроль 5,23±0,21, опыт 4,56±0,185). В подострой фазе было повышение ИЯОР с 1,47±0,06 до 1,75±0,09 при $p<0,05$ по отношению к контролю по t-критерию Стъюдента. Коэффициент вариации ФЦ достигал от 6,7 до 15,7%. Обнаружено повышение количества ядрышек, что говорит о стимулирующем влиянии на синтез рРНК. В фазе реабилитации произошло снижение количества МЯ с 0,10±0,03 до 0,05±0,04 в клетках. Вероятно, произошло угнетение синтеза рРНК. Зафиксированы достоверные различия по числу ФЦ при $p<0,01$ между группами животных, в подострой фазе при введении OX1R SB-408124. Расчет показателя «количество ФЦ на 1 ядрышко» в контроле и после введения OX1R SB-408124 в различных фазах выявил следующее: в контрольной группе 1,20, в острой фазе после введения 1,46, в подострой фазе в контроле 1,47, а в опыте 1,75, в фазе реабилитации в контроле 1,27, а в опыте 1,10.

Выводы. Средняя частота клеток с МЯ *in vivo* составила 0,10% в контроле; при введении OX1R SB-408124 наблюдалось незначительное снижение данного показателя у животных, подвергнутых введению в острой фазе 0,09%. Частота клеток с АМ в контроль-

ной выборке составила 0,08±0,007%, а в опыте в острой фазе 0,06±0,004 это ниже при ρ<0,05 по отношению к контролю по t-критерию Стъюдента. Поэтому в целом, можно сказать о положительном влиянии орексина на пролиферативную активность семенников самцов крыс линии Wistar. Препарат не оказывает токсичекое действие на клеточные популяции семенников и стабилизирует геном [2]. Поэтому наши исследования подтверждают генетическую, токсическую и канцерогенную безопасность антагониста OX1R рецепторов орексина SB-408124.

Литература

1. *Косякова Г. П. Лебедев А. А., Шабанов П. Д.* Влияние антагониста орексина OX1R SB-408124 на кариотипическую стабильность и экспрессию рибосомных цистронов периферической крови у крыс // Обз. по клин. фармакологии и лек. терапии.— 2015.— Т. 13, спецвып.— С. 75–78.
2. *Косякова Г. П. Лебедев А. А., Шабанов П. Д.* Влияние антагониста орексиновых OX1R-рецепторов SB-408124 на миелограмму костного мозга и лиеноцитограмму грызунов // Обз. по клин. фармакологии и лек. терапии.— 2015.— Т. 13, спецвып.— С. 78–80.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У БОЛЬНЫХ ЭПИЛЕПСИЕЙ И АССОЦИИРОВАННЫМИ НЕПСИХОТИЧЕСКИМИ ПСИХИЧЕСКИМИ РАССТРОЙСТВАМИ

Н. А. Сивакова, Л. В. Липатова, А. П. Коцюбинский
Санкт-Петербургский научно-исследовательский психоневрологический институт им. В. М. Бехтерева Министерства здравоохранения РФ, Россия

sivakova-natali@rambler.ru

В последние годы получены многочисленные экспериментальные и клинические данные, сделавшие правомочным рассмотрение воспалительной теории эпилептогенеза [1, 2]. Считается, что хронизации воспалительного процесса при эпилепсии способствует активация микроглии и астроглиоз, сопровождающиеся повреждением нейронов. Особое внимание уделяется цитокинам, главным образом потому, что они являются природными про- и антиконвульсантами [3]. У большинства (до 80%) больных эпилепсией (БЭ) выявляются стойкие нарушения психики в форме значительных личностных и аффективных расстройств, коморбидных эпилепсии, ввиду наличия общих нейробиологических механизмов, включая процессы хронического нейровоспаления.

Цель исследования — изучить особенности цитокинового профиля у БЭ с различным контролем припадков и связь этих нарушений с НПР.

Материалы и методы. Обследовано 160 больных эпилепсией (БЭ). Первую группу составили 80 пациентов ФРЭ, вторую — 80 больных контролируемой эпилепсией (КЭ), контрольную группу — 30 человек здоровых доноров (ЗД). В работе использовались лабораторный метод (исследование цитокинов (IL-1β, IL-8, RaIL-1) в крови и ликворе БЭ), клинико-психопатологический, клинико-неврологический, психометрический методы исследования.

Установлено, что медиана провоспалительных цитокинов (ПВЦ) IL-1β и IL-8 у больных эпилепсией существенно превышала показатели здоровых лиц. Медиана концентрации IL-1β в плазме крови в группе больных эпилепсии составила 316,5±14,0 пг/мл, в группе здоровых доноров — 0,36±0,01 пг/мл (ρ (U)<0,01). Уровень концентрации IL-8 в плазме крови в группе больных эпилепсией составил 157,1±99,4 пг/мл, в группе здоровых доноров — 0,94±0,2 пг/мл (ρ (U)<0,05). В ликворе так же выявлено статистически значимое повышение уровня ПВЦ IL-1β и IL-8, медиана концентрации которых составила 77,1±17,3 пг/мл и 6,4±2,5 пг/мл соответственно. Однако, средние значения концентрации рецепторного антагониста IL-1β (RaIL-1) у больных эпилепсией была существенно ниже в плазме крови и не определялась ликворе пациентов. При этом медиана концентрации RaIL-1 (420±116 пг/мл) в плазме крови в группе здоровых доноров была существенно выше, чем в плазме крови больных эпилепсией (38±13 пг/мл) (ρ (U)<0,01).

Проведенное исследование показало, что у БЭ имеется существенное нарушение профиля цитокинов в плазме крови: повышены уровни ПВЦ (IL-1β, IL-8) и снижена концентрация RaIL-1. Наличие повышенного уровня цитокинов IL-1β и IL-8 в ликворе и плазме крови у БЭ свидетельствует о нарушении гематоэнцефалического барьера и существовании системного воспалительного процесса, а отсутствие RaIL-1 — о снижении защитных факторов воспаления.

Учитывая достоверное различие уровня ПВЦ IL-1β между основной группой и контрольной группой, было сделано предположение, что данные показатели могут быть информативны при различных вариантах течения эпилепсии.

При определении цитокинов семейства IL-1β у больных эпилепсией с различными вариантами течения заболевания выявлено, что показатели IL-1β у больных с ФРЭ как в плазме, так и в ликворе превышали аналогичные показатели у больных с КЭ (ρ (U)<0,05).

Значение противовоспалительного RaIL-1 у больных с ФРЭ было низким в плазме крови и не определялся в ликворе, в группе больных с КЭ медиана концентрации этого цитокина была вполне определима как в плазме так

и в ликворе. Таким образом, в группе больных с КЭ показатели рецепторного антагониста IL-1, как и соотношение концентраций RaIL-1 к IL-1β были существенно выше, чем при резистентной форме.

Была оценена взаимосвязь уровня ряда иммунных параметров, (IL-1β, IL-8, RaIL-1) с выраженностью НПР у больных с ФРЭ. Наибольшие изменения иммунного статуса обнаружены у больных с НПР депрессивного регистра, установлена прямая корреляционная связь между иммунным дисбалансом и наличием депрессивных нарушений ($r=0,67$; $p<0,01$) ($r=0,71$; $p<0,01$) ($r=-0,83$; $p<0,01$).

Представленные данные подтверждают роль воспалительного процесса в патогенезе эпилепсии, проявляющегося нарушением баланса про- и противовоспалительных цитокинов с максимальной выраженностью этих нарушений у больных ФРЭ и НПР депрессивного регистра.

Литература

1. *De Simoni M. G.* Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus / M. G. De Simoni et al. // European Journal of Neuroscience.— 2000.— Vol. 12 (7).— P. 2623–2633.
2. *Lehtimäki K. A., Keränen T., Huhtala H. et al.* Regulation of IL-6 system in cerebrospinal fluid and serum compartments by seizures: the effect of seizure type and duration // J. Neuroimmunology.— 2004.— Vol. 152 (1).— P. 121–125.
3. *Vezzani A., Balosso S., Ravizza T.* The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy // Brain, Behavior, and Immunity.— 2008.— Vol. 22 (6).— P. 797–803.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА ИШЕМИЗИРОВАННОГО МИОКАРДА

В. П. Смирнов, И. А. Панышева

Нижегородская государственная медицинская академия, Россия

nati207@rambler.ru

Введение. Гомеостаз в миокарде поддерживается за счет процессов протекающих в интерстициальной ткани, которую можно считать одним из основных звеньев микроциркуляции. Для понимания патологического процесса необходимо учитывать все компоненты и функциональные связи структурного элемента изучаемого объекта.

Цель исследования: определение роли перикапиллярного пространства миокарда и сопоставление ультраструктурных изменений компонентов функционального элемента миокарда (ФЭМ) в условиях острой ишемии в различных слоях сердечной мышцы.

Объекты, материалы и методы. Объектами исследования служили самцы беспородных собак массой 15–25 кг. Выполнение работы одобрено Этическим комитетом ФГБОУВО «НижГМА» МЗ РФ. Для ультраструктурного исследования взяты кусочки миокарда через всю толщу стенки левого желудочка у 5 собак на высоте эфирно-кислородного наркоза, через 2 ч после перевязки передней ветви левой коронарной артерии. Контролем служил материал от тех же собак, взятый из неизменённой зоны левого желудочка. Материал фиксировали в 2,5%-м растворе глютаральдегида с последующей дофиксацией в 1%-м растворе четырёхокиси осмия, обезвоживали в спиртах и заключали в аралдит. Изготавливали ультратонкие срезы, контрастировали их уранилацетатом и цитратом свинца [1]. Ставилась PAS (periodic acid — Schiff)-реакция с контролем амилазой.

Результаты и их обсуждение. В субэндокардиальном слое капилляры имеют суженный просвет, базальная мембрана истончена и разрыхлена. В отдельных капиллярах интрамурального слоя встречаются участки с умеренным расширением просвета капилляров и локальной утратой базальной мембраны. Эндотелиальные клетки капилляров отёчны, отмечено появление микропиноцитозных везикул, по люминальному краю определяются цитоплазматические отростки и инвагинации. Саркоплазматический ретикулум деформирован. Глыбки хроматина в ядрах располагаются маргинально. Наиболее выраженные изменения эндотелиальных клеток отмечены в интрамуральном и субэндокардиальном слоях. Большинство перицито-эндотелиальных контактов нарушено. В перикапиллярном пространстве под эндокардом отмечается выраженный отёк. Основное вещество негомогенно, содержит дезориентированные утолщённые волокна (коллагеновые, эластические) и очаги с рыхлыми аморфными массами. Отёчная жидкость представлена хлопьевидным веществом средней электронной плотности. Непосредственно в перикапиллярном пространстве обнаруживаются свободно лежащие эритроциты, вблизи микрососудов — деформированные тучные клетки. Во всех слоях сердечной мышцы с помощью PAS-реакции выявляется мелкая гранулярность по ходу перикапиллярного пространства. Контроль с амилазой количественно не изменил продукт реакции, что свидетельствует об отсутствии гликогена. В большинстве КМЦ субэпикардиального и интрамурального слоя показаны конденсация цитоплазмы и её глыбчатость. Ядерная оболочка неровная, перинуклеарное пространство расширено за счёт отёка. Большинство миофибрилл КМЦ интрамурального слоя разволокнены до отдельных миофиламентов и имеют продольную исчерченность. Саркомеры укорочены, I-диски нечёткие, их чередование нарушено. В релаксированных саркомерах эндокар-

диальной зоны зафиксировано большое количество расширенных Н-зон. Часть волокон находится в состоянии пересокращения. В интрамуральном слое отмечены участки разрыва Z-полосок. В отдельных КМЦ определяются проявления зернистой и гиалиново-капельной дистрофии. В интрамуральном слое отмечено набухание митохондрий, в субэпикардиальном и субэндокардиальном — гиперплазия. Кристы во всех слоях укорочены, фрагментированы. Т-система, расположенная преимущественно около Z-пластинки, деформирована. Ширина межклеточных пространств в области вставочного диска значительно варьирует. В норме в интерстициальном пространстве происходит накопление полипептидов различного происхождения и образование белковых макромолекул, в него клетки выделяют продукты своей жизнедеятельности, а также в интерстиции располагается система каналов, по которым осуществляется транспорт воды и растворенных в ней молекул. Отмеченные нами изменения в перикапиллярном пространстве (расширения перикапиллярной зоны под эпикардом и в интрамуральном слое, выраженное обособление микрососудов и КМЦ под эндокардом) свидетельствуют о нарушении в работе дренажных механизмов и повышении проницаемости гистогематического барьера в связи с появлением продуктов нарушенного метаболизма. Авторы отмечают постоянное присутствие аморфных и гиалиноподобных субстратов в перикапиллярном пространстве [2]. Состояние перикапиллярного пространства является важным патогенетическим фактором, определяющим структурные изменения всех компонентов миокарда. Перестройка интерстициальной ткани приводит к изменениям транспортно-трофических процессов, непосредственно поддерживающих гомеостаз.

Заключение. Повышение мембранной проницаемости в условиях острой ишемии приводит к изменению диаметра КМЦ, повреждению органелл, развитию зон пересокращения миофибрилл и нарастанию межклеточного отёка, наиболее выраженного в интрамуральном и субэндокардиальном слоях. В интерстиции в условиях ишемической гипоксии происходят выраженные нарушения механизмов регуляции микроциркуляции и взаимной работы клеток вследствие образования рыхлых аморфных масс, которые блокируют интерстициальное пространство.

Литература

1. *Reynolds E. S.* The use of lead citrate and pH as an electron-opaque stain in electronic microscopy // J. Cell. Biol.— 1963.— Vol. 17.— P. 208–212.
2. *Смирнов В. П., Скворцова И. Е., Щербатова Н. А.* Морфометрическая и гистохимическая характеристика капилляров и мышечных клеток миокарда собак // Арх. анат.— 1990.— № 9.— С. 61–64.

РАЗЛИЧИЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФОРМ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КРЫСЫ

В. Б. Соболев, О. В. Сальникова, Д. Н. Воронков
Научный центр неврологии, Москва, Россия

neurolab@yandex.ru

Введение. По данным литературы, альфа-синуклеин (α-Syn) связан с нейродегенеративным процесом при болезни Паркинсона (БП) и других сходных заболеваниях [1, 2]. Предполагается, что при БП нарушение конформации белка и накопление агрегатов α-Syn в нейронах приводит к их гибели и начинается с периферической нервной системы (ПНС), распространяясь впоследствии на структуры продолговатого и среднего мозга [2]. Выявление аномального накопления α-Syn может способствовать ранней диагностике БП [2]. Функция α-Syn и его взаимодействие с другими белками изучены недостаточно. Показана связь фосфорилирования α-Syn с его патологической агрегацией [2]. В пресинаптических окончаниях α-Syn, по-видимому, ассоциирован с везикулярным аппаратом. Кроме того, α-Syn обнаруживают в цитоплазме, митохондриях и ядрах нейронов, при этом его локализация значительно зависит от используемых антител [3, 4], что, вероятно, связано с разнообразием конформаций белка, его посттрансляционными модификациями и перекрестной реактивностью антител с другими белками семейства. Исследования распределения α-Syn в ПНС в норме неполны и часто противоречивы.

Цель исследования: изучить локализацию α-Syn и его фосфорилированной формы в спинном мозге (СМ) и ПНС интактных крыс Вистар.

Объекты, материалы и методы. Исследовали срезы СМ и спинальных ганглиев (СГ) самцов крыс Вистар массой 280–300 г, на уровне шейных и грудных сегментов, а также чревный ганглий при окрашивании на нефосфорилированный α-Syn. Срезы обрабатывали 98%-й муравьиной кислотой или нагреванием в цитратном буфере (90° С, pH=6,0). Нефосфорилированный α-Syn выявляли с помощью кроличьих поликлональных антител к С-концевой последовательности белка (S3062; Sigma, США), а фосфорилированый по 129-му остатку серина α-Syn (α-Syn-P129) — с помощью мышиных моноклональных антител фирм Wako (№ 015-25191) и Biolegend (№ MMS-5091). Реакцию проводили иммунофлуоресцентным методом. Негативный контроль выполняли без первичных антител.

Результаты и их обсуждение. Нефосфорилированный α-Syn в исследованных структурах распределялся неравномерно: его не выявили в СГ, корешках СМ, но обнаружили плотное окрашивание цитоплазмы нейронов и постганглионарных волокон чревного ганглия, нервных сплетений сте-

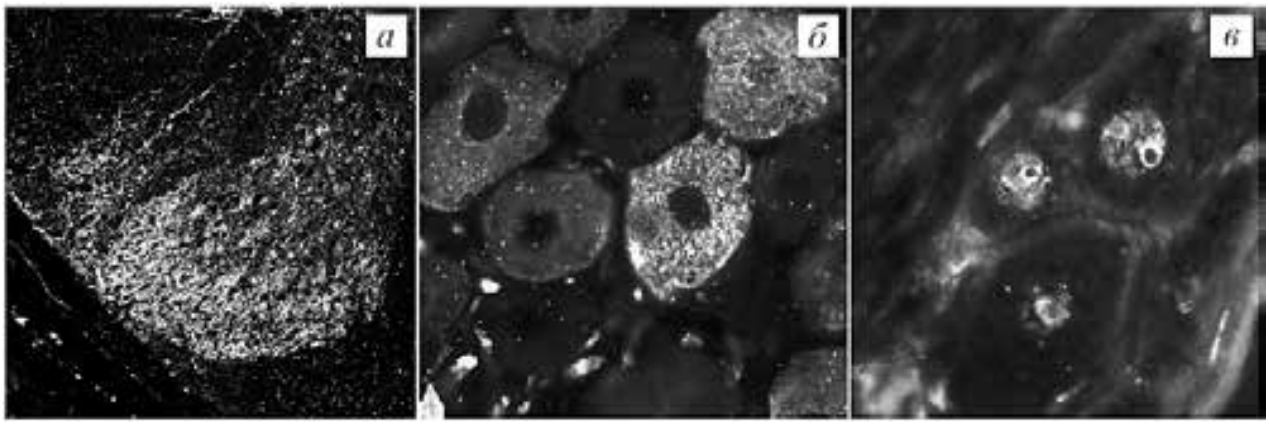


Рисунок. Различия внутриклеточной локализации альфа-синуклеина и его фосфорилированной формы. *а* — пресинаптическая локализация нефосфорилированного α-Syn в дорсальных рогах СМ крысы (ув. об. ×10). *б, в* — выявление α-Syn-P129 в нейронах СГ различными антителами (*б* — Biolegend; *в* — Wako, ув. об. ×100).

нок сосудов и пресинаптических окончаний в дорсальных рогах СМ (I–II пластины по Рекседу). Антитела к α-Syn-P129, использованные в работе, значительно различались характером связывания. Антитела фирмы Wako выявляли преимущественно ядра крупных нейронов СГ, а также отдельных нейронов СМ с наиболее интенсивным окрашиванием вокруг ядрышка. Нервные волокна выявлялись редко, лишь в крупных нервных стволах, и они имели слабое, точечное окрашивание. Антитела фирмы Biolegend, напротив, связывались с нервными волокнами в белом веществе и корешках СМ. В СГ выявляли интенсивное окрашивание цитоплазмы крупных нейронов.

Проведенное исследование показало широкое распространение α-Syn в разных типах нейронов ПНС. Выявление нефосфорилированного α-Syn в телах норадренергических нейронов чревного ганглия согласуется со сведениями о его локализации в катехоламинергических структурах [3]. Обнаруженные различия внутриклеточной локализации α-Syn и α-Syn-P129, также находят подтверждения в литературе [4], а различия в выявляемой локализации α-Syn-P129 при реакции с разными антителами могут объясняться перекрестной реактивностью. Следует отметить, что сходный характер распределения в нейронах (ядерная и цитоплазматическая локализация) был описан также при сопоставлении двух клонов антител к нефосфорилированному α-Syn [3]. Полученные данные позволяют предположить, что выявленный характер распределения разных форм α-Syn указывает на зависимость связывания антител от пространственной структуры белка, изменяющейся при фосфорилировании [4], и отражает наличие нескольких функционально различных пулов α-Syn в нейронах.

Заключение. Таким образом, проведенная работа показала, что в ПНС интактных крыс присутствует как фосфорилированный, так и нефосфорилированный α-Syn, причем характер его внутриклеточной локализации зависит от типа нейронов.

Литература

1. *Илларионкин С. Н.* Паркинсонизм с ранним началом // Нерв. болезни. –2006.— № 3.— С. 14–20.
2. *Del Tredici K., Braak H.* Review: Sporadic Parkinson's disease: development and distribution of α-synuclein pathology // Neuropath. App. Neurobiol.— 2016.— Vol. 42, № 1.— P. 33–50.
3. Different sub-cellular localization of alpha-synuclein in the C57BL\6J mouse's central nervous system by two novel monoclonal antibodies / Vivacqua G., Gasini A., Vaccaro R., Fornai F., Yu S., D'Este L. // J. Chem. Neuroanat.— 2011.— Vol. 41.— P. 97–110.
4. Novel link between the conformations, exposure of specific epitopes, and subcellular localization of -synuclein / Nam M. K., Han J. H., Jang J. Y., Yun S. E., Kim G. Y., Kang S., Rhim H. // Biochim. Biophys. Acta.— 2015.— Vol. 1850, № 12.— P. 2497–2505.

РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ МЕДИАЛЬНОГО АРКУАТНОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА ПРИ ГИПОГОНАДИЗМЕ У САМЦОВ КРЫС

[1]А. В. Фёдоров, [2]Ю. Н. Юхлина, [1]А. В. Дробленков
[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[2]Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия
9516313@mail.ru

Введение. Известно, что уровень тестостерона изменяет выработку гонадолиберина нейронами аркуатного комплекса ядер гипоталамуса, воздействуя на них как за счет связывания рецепторов стероида самими нейросекреторными

клетками, так и через рецепторы к кисспептинам (медиаторам) ассоциативных клеток этих же ядер [1]. Поэтому снижение концентрации тестостерона вызывает задержку полового развития (гипогонадизм), одной из причин которого является угнетение функций нейронов ядер гипоталамуса. Реактивные изменения нейронов аркуатных ядер гипоталамуса в модели неонатального гипогонадизма мало изучены, тогда как эти данные способствовали бы более глубокому пониманию механизмов его развития.

Цель исследования: установить реактивные изменения нейронов медиального аркуатного ядра (МАЯ) гипоталамуса у взрослых крыс при моделировании гипогонадизма после рождения.

Объекты, материалы и методы. У 7 самцов крыс Вистар в возрасте 2–3 дней после рождения, до завершения дифференцировки нейронов МАЯ, под эфирным наркозом удаляли одну гонаду по известной методике [2]. Контролем служили 7 интактных крыс. В возрасте 4 мес., 10 дней всех животных декапитировали. На площади 0,01 мм^2 во фронтальных парафиновых срезах право- и левосторонних МАЯ, bregma –3,14 [3], окрашенных методом Ниссля, при микроскопии в проходящем свете подсчитывали число тел малоизмененных, измененных гипохромных, гиперхромных и теневидных нейронов после их идентификации по классификации Ю. М. Жаботинского [4], устанавливали площадь малоизмененных нейронов с помощью программы Imagescope (Электронный анализ, Россия). Различия средней величины и ее ошибки ($\bar{X}\pm S_{\bar{X}}$) считали значимыми при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Большинство тел нейронов МАЯ в контроле были неизмененными. Они располагалось по-отдельности друг от друга и от клеток глии, содержали вещество Ниссля и светлое ядро; ядрышко было отделено от ядерной оболочки. Единичные гипохромные и сморщенные гиперхромные клетки обладали признаками нарушения водно-солевого баланса [4]. Нейроны-«тени» содержали сморщенные, нечеткие и слабо окрашенные контуры поверхности ядра или его фрагментов. Содержание единичных измененных нейронов у здоровых крыс входит в стандарт нормы [5]. В МАЯ гипогонадных крыс происходило уменьшение размеров нормохромных и наименее измененных нейронов ($p<0,05$). Большинство их тел было объединено в группы, в состав которых входили также и клетки-сателлиты. Измененные гипохромные и гиперхромные клетки, уменьшенные в размерах, и теневидные нейроны по строению не отличались от соответствующих фенотипических форм у интактных крыс, но отличались от последних возросшими долями ($p<0,05$).

Заключение. Объединение тел глиоцитов и нейронов имеет компенсаторно-приспособительное значение для нейронов, поскольку установлена способность передачи телам нейронов клетками-сателлитами РНК, аминокислот и факторов роста [6]. Установленная нами малоизвестная способность к группировке тел нейронов между собой, обычно считающихся оседлыми клетками, подтверждается в условиях ишемии и стресса данными электронной микроскопии [7]. Авторы наблюдали формирование простых, плотных и коммуникационных контактов между телами нейронов, а также прямые нейровазальные контакты. Таким образом, в МАЯ гипоталамуса половозрелых гипогонадных животных происходят гибель и атрофические изменения нейронов, выраженные в разной степени, что сочетается с компенсаторно-приспособительным усилением нейро-глиальных взаимоотношений и объединением тел нейронов.

Литература

1. *Gottsch M. L., Clifton D. K., Steiner R. A.* Kisspepeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis // Mol. Cell. Endocrinol.— 2006.— Vol. 254–255.— P. 91–96.
2. *Киршенблат Я. Д.* Практикум по эндокринологии.— М.: Высшая школа, 1969.
3. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates, Fourth Edition.— Academic Press, 1998.— Fig. 32.
4. *Жаботинский Ю. М.* Нормальная и патологическая морфология нейрона.— Л: Медицина, 1965.— 323 с.
5. *Дробленков А. В.* Патологические изменения нейронов мезокортиколимбической дофаминергической системы у здоровых людей и крыс // Морфология.— 2010.— Т. 137, Вып. 3.— С. 11–17.
6. The trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain / Dai X., Lercher L. D., Clinton P. M., Du Y., Livingston D. L., Vieira C., Yang L., Shen M. M., Dreyfus C. F.// J. Neurosci.— 2003.— Vol. 23, № 13.— P. 5846–5853.
7. Влияние физической нагрузки на ультраструктурные изменения в коре головного мозга крыс / Гелеранская О. А., Гончаров Н. В., Маслова М. Н., Парамонова Н. М., Тавровская Т. В. // Морфология.— 2016.— Т. 149, Вып. 3.— С. 62.

ОБЩИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

А. Г. Хотулёва

Научно-исследовательский институт медицины труда, Москва, Россия

hotuleva_an@mail.ru

Введение. Бронхиальная астма и метаболический синдром связаны целым рядом патогенетических механизмов, которые приводят к формированию феномена взаимоотягощения, ограничивающего достижение контроли-

руемого течения бронхиальной астмы с одной стороны, и повышающего риск развития сахарного диабета (СД), заболеваний сердечно-сосудистой системы с другой стороны [1]. Среди общих генетических детерминант можно выделить гены, характеризующие воспалительные и иммунные реакции как при астме, так и при метаболическом синдроме и гены, характеризующие активность ренин-ангиотензин-альдостероновой (РААС) и симпатической нервной систем.

Цель исследования: изучить полиморфизмы генов, участвующих как в патогенезе профессиональной бронхиальной астмы (ПБА), так и метаболического синдрома (МС), у больных ПБА для выявления ассоциации данных полиморфизмов с компонентами МС и течением ПБА.

Материалы и методы. Для решения поставленных в работе задач обследовано 155 человек (109 женщин и 46 мужчин) в возрасте 57,1±10,6 лет с установленным диагнозом ПБА на базе клиники ФГБНУ «НИИ МТ». МС по критериям Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК, 2009) был выявлен у 68,3% больных ПБА, что свидетельствует о высокой распространенности сочетания ПБА и МС. Обследование выполнено с информированного согласия пациентов, работа проведена с соблюдением этических стандартов, проведение исследования одобрено заключением локального комитета по этике ФГБНУ «НИИ МТ».

Дополнительно к общеклиническому обследованию больным ПБА определяли уровни лептина, инсулина в сыворотке крови, полиморфизмы C174G гена интерлейкина-6 (IL-6), C589T гена интерлейкина-4 (IL-4), Gln223Arg гена рецептора лептина (LEPR), инсерции/делеции (I/D) Alu-фрагмента гена ангиотензинпревращающего фермента (АПФ). Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы BIOSTAT.

Результаты и их обсуждение. Одним из цитокинов, выделяемых жировой тканью и оказывающих различные эффекты на регуляцию воспалительных процессов, является IL-6. Показано, что наличие генотипа CC (полиморфизм C174G) гена IL-6, характеризующегося гиперпродукцией данного цитокина, повышает риск развития метаболического синдрома в 4,6 раза (ОШ=4,6, 95% ДИ=1,463–14,467, $p<0,05$) и СД 2 типа в 4,2 раза (ОШ=4,184, 95% ДИ=1,555–11,258, $p<0,05$). При анализе клинического течения ПБА в зависимости от генотипа IL-6 выявлена связь между более тяжелым течением астмы и аллелью C, что может быть связано как с большей распространенностью в данной группе МС, так и участием IL-6 в патогенезе ПБА. Полиморфизмы генов цитокинов способствуют развитию дисбаланса в сторону провоспалительных цитокинов, что инициирует развитие воспалительного процесса, играющего ключевую роль как в развитии ПБА, так и МС. Главным цитокином, вовлеченным в патогенез аллергического ответа и участвующем в развитии аллергической астмы, является IL-4. При этом он также принимает участие в регуляции метаболизма липидов [2], была показана ассоциация дислипидемии с полиморфизмом C589T гена IL-4.

В развитии МС важную роль играет выделяемый жировой тканью лептин. Показана ассоциация аллели Gln (полиморфизм Gln223Arg) гена LEPR с МС вследствие развития лептинорезистентности и гиперлептинемии, выявлена корреляция уровня лептина с уровнем инсулина ($r=0,580$, $p<0,001$). При ПБА лептин способен поддерживать воспалительный процесс путем стимуляции клеточного иммунного ответа с увеличением продукции провоспалительных цитокинов и также оказывает прямое действие на эпителий бронхов, что приводит к гиперреактивности бронхов [3]. Это представляется актуальным в связи с тем, что при ПБА выявлена гиперлептинемия, которая может быть связана с применением при ПБА глюкокортикостероидов, стимулирующих синтез лептина.

Общим патогенетическим звеном ПБА и МС может являться также полиморфизм АПФ, ключевого фермента РААС, чья роль в развитии артериальной гипертензии (АГ) широко известна, но в последнее время изучается и его влияние на формирование астмы. АПФ превращает ангиотензин I в ангиотензин II, который может участвовать в патогенезе ПБА в связи со способностью вызывать гиперреактивность бронхов и потенцировать бронхоконстрикцию [4]. Показано, что у лиц с генотипом DD гена АПФ, ассоциированным с более высоким уровнем фермента, ПБА развивается при меньшем стаже работы в контакте с веществами раздражающего и сенсибилизирующего действия — у лиц с генотипом DD стаж работы до развития ПБА составлял 15,8±6,7 лет, у лиц с генотипами ID, II — 19,7±7,0 лет ($p<0,01$).

Выводы. ПБА и МС связаны целым рядом патогенетических механизмов, одним из которых является наличие общих генетических детерминант, характеризующих активность воспалительных процессов, риск развития метаболических нарушений, АГ и бронхоконстрикции, что обусловливает высокую распространенность сочетания ПБА и МС и необходимость разработки комплексной профилактики данного сочетания.

Литература

1. *Яковлева О. Я., Жамба А. О., Мазур Ю. В.* Коморбидность бронхиальной астмы, хронической обструктивной болезни легких и сердечно-сосудистой патологии // Рациональная фармакотерапия.— 2008.— № 1 (06).— С. 64–67.
2. *Tsao C. H., Shiau M. Y., Chuang P. H. et al.* Interleukin-4 regulates lipid metabolism by inhibiting adipogenesis and promoting lipolysis // J Lipid Res.— 2014.— Vol. 55 (3).— P. 385–97.
3. *De Rosa V., Procaccini C., Calì G. et al.* A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation // Immunity.— 2007.— Vol. 26. № 2.— P. 241–255.
4. *Zhang Y. G., Li X. B., Zhang J. et al.* The I/D polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and asthma risk: a meta-analysis // Allergy.— 2011. –Vol. 66.— P. 197–205.

ВЛИЯНИЕ БИСФЕНОЛА А НА РАЗВИТИЕ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШЕЙ В ДВУХ ПОКОЛЕНИЯХ

[1,2]В. Ч. Чан, [2]Е. М. Нониашвили
[1]Воронежский государственный университет, Россия
[2]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

truongleky@gmail.com

Введение. В настоящее время стало очевидным, что влияние внешних агентов на зародыши на ранних этапах развития может приводить к заболеваниям во зрелом возрасте. Поэтому становится особенно важным исследование воздействия экотоксикантов на раннее развитие зародышей. Вторым актуальным вопросом является исследование возможных отклонений развития у потомства экспонированных животных. Бисфенол А (БФА) представляет собой органическое вещество, широко используемое в производстве поликарбонатного пластика, который является материалом для изготовления пищевых контейнеров, а также входящее в состав композитного пломбировочного материала, применяемого в стоматологии. Было показано, что высокие дозы БФА могут вызывать сердечно-сосудистые заболевания, диабет, дисфункцию печени [1] и половое расстройство у мужчин [2], а малые дозы — постнатальный эстрогенный эффект [3].

Цель исследования: изучение влияния малых доз БФА на развитие доимплантационных зародышей мышей in vivo в двух поколениях.

Объекты, материалы и методы. Для экспериментов использовали масляный раствор бисфенола А. Контролем служили: группа интактных животных и группа животных, которые в первый день беременности подвергались воздействию кунжутного масла, используемого в качестве растворителя БФА. Эксперименты проводили на самках мышей-гибридов C57BL×CBA, которым в первый день беременности однократно вводили внутрибрюшинно 0,8 мг БФА, содержащегося в 0,1 мл масла, что соответствовало 40 мг БФА на килограмм массы животного. Мыши контрольной группы с введением масла получали, соответственно, инъекцию 0,1 мл кунжутного масла. Животных умерщвляли спустя трое суток после введений. Зародыши вымывали из матки, подсчитывали количество морул и бластоцист, затем из всех зародышей готовили хромосомные препараты [4] и подсчитывали количество бластомеров в зародышах. Второе поколение зародышей получали путём скрещивания самцов, родившихся от матерей, подвергшихся внутриутробно воздействию БФА или масла, с интактными самками. Контролем в этой серии экспериментов служили зародыши второго поколения от интактных мышей.

Результаты и их обсуждение. Показано, что введение малых доз БФА беременным самкам оказывает влияние на развитие зародышей как в первом (F1), так и во втором (F2) поколениях. У зародышей F1, подвергшихся внутриутробному воздействию БФА, процесс формирования бластоцист происходил быстрее: 71% зародышей находился на стадии бластоцисты, тогда как в группе зародышей от интактных мышей — только 66%, а в группе, где на зародыши воздействовали маслом, доля бластоцист составила 61%. Однако количество бластомеров в зародышах, подвергшихся воздействию БФА, было меньше (42±1,7), чем в зародышах контрольной группы (47±1,6) и в группе после воздействия маслом (46±1,8). Разница между зародышами интактной контрольной группы и зародышами, подвергшимися воздействию БФА статистически достоверна (p=0,027). Таким образом, под воздействием БФА процесс формирования бластоцист происходил быстрее, но при этом зародыши имели меньшее количество бластомеров, т. е. процесс дробления зародышей замедлялся. Эти результаты согласуются с нашими ранее опубликованными данными, полученными в экспериментах *in vitro* [5].

В F2 наблюдалась иная зависимость. Среднее количество бластоцист в зародышах от интактных мышей составляло 86%, у потомков мышей с внутриутробным воздействием БФА — 69%, а у зародышей от потомков животных, получавших масло,— 59%. Таким образом, в F2 мышей, подвергшихся воздействию БФА, количество бластоцист снижено, по сравнению с зародышами от интактных животных, на 17%. Среднее количество бластомеров у зародышей второго поколения интактной контрольной группы составляло 49±1,7, в группе с воздействием БФА — 40±5,8, и 66±3,6 бластомеров было у потомков мышей, подвергшихся воздействию масла. Разница в F2 между интактной контрольной группой и зародышами, подвергшимися воздействию БФА, статистически недостоверна (p=0,17).

Заключение. Наблюдается эффект от воздействия БФА на зародышей, полученных не только от экспонированных беременных самок, но и в следующем поколении, уже не подвергавшемся воздействию токсикантом. Эти данные требуют дальнейших исследований. Наиболее вероятным механизмом воздействия малых доз экотоксикантов, не приводящих к мутациям, (в частности, БФА), но ведущих к отклонениям в раннем развитии, в т. ч. в последующих поколениях, является изменение уровня метилирования дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). По нашим предварительным данным, влияние БФА оказывает влияние на процесс метилирования ДНК доимплантационных зародышей у мышей.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-04642-а.

Литература

1. Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model / Hassan Z. K., Elobeid M. A., Virk P., Omer S. A., ElAmin M., Daghestani M. H., Alolayan E. M. // Oxid. Med. Cell. Longev.— 2012.— Vol. 2012.— Art. ID 194829.— 6 pp.
2. *Паткин Е. Л., Софронов Г. А.* Эколого-зависимые заболевания человека. Эпигенетические механизмы

возникновения и наследования // Мед. акад. журн.— 2015.— Т. 15, № 3.— С. 7–23.
3. Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development / Takai Y., Tsutsumi O., Ikezuki Y., Kamei Y., Osuga Y., Yano T., Taketan Y. // Reprod. Toxicol.— 2001.— Vol. 15, № 1.— P. 71–74.
4. *Dyban A. P.* An improved method for chromosome preparation from preimplantation mammalian embryos, oocytes or isolated blastomeres // Stain Technol.— 1983.— Vol. 58, № 2.— P. 69–72.
5. *Ониашвили Е. М., Софронов Г. А., Паткин Е. Л.* Влияние малых доз бисфенола А на доимплантационное развитие зародышей мышей in vitro // Акад. журн. Зап. Сибири.— 2013.— Т. 9, № 3 (46).— С. 100–101.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ МОЗГА: РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК И ГИСТОНА Н3

А. В. Чурилова, М. О. Самойлов
Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

annch05@mail.ru

Введение. Гипоксическая толерантность мозга — повышение устойчивости нейронов чувствительных образований мозга к тяжелым формам гипоксии, достигаемое, в частности, путем воздействия на организм умеренной гипоксии в режиме прекондиционирования. Механизмы формирования гипоксической толерантности связаны с перестройкой внутриклеточных процессов, синтезом белков и изменением активности генома, которая регулируется рядом эпигенетических механизмов, в том числе метилированием гистонов и ДНК. Метилирование гистонов может приводить как к активации, так и к ингибированию транскрипции генов, в зависимости от сайта, по которому происходит метилирование. В частности, моно-, ди- и триметилирование гистона Н3 по лизину-4 приводит к активации транскрипции, тогда как моно-, ди- и триметилирвоание гистона Н3 по лизину-9 — к ее репрессии [1]. Метилирование ДНК связывают преимущественно с ингибированием транскрипции генов. Очевидно, данные модификации могут вовлекаться в механизмы формирования гипоксической толерантности мозга.

Цель исследования: оценка изменения степени метилирования гистона Н3 по лизину-4, -9 и ДНК при действии повреждающей или протектирующей гипобарической гипоксии.

Результаты и их обсуждение. Исследование выполнено на взрослых самцах крыс линии Вистар (180–200 г). Применяли гипобарическую гипоксию в барокамере проточного типа в следующих режимах: 1) тяжелая гипобарическая гипоксия (ТГГ; 180 мм рт. ст., 3 ч); 2) умеренная гипобарическая гипоксия (УГГ; 360 мм рт. ст., 3 сеанса по 24 ч, интервал 24 ч); 3) умеренная гипобарическая гипоксия, и через 24 ч — тяжелая гипобарическая гипоксия (УГГ+ТГГ). Иммуногистохимический анализ проводили на срезах мозга животных. Применяли первичные антитела к диметилированному по лизину-9 гистону Н3 (Н3К9me2) (Abcam; 1:200), ди- и триметилированному по лизину-4 гистону Н3 (Н3К4me2,3) (Abcam; 1:200), метилированной ДНК (meDNA) (Santa Cruz; 1:75). Результаты представлены в процентном отношении к контролю. ТГГ приводила к увеличению степени метилирования Н3К9 и ДНК в нейронах неокортекса и гиппокампа крыс. Одновременно с этим отмечалось снижение иммунореактивности к Н3К4me2,3 в гиппокампе (таблица). УГГ оказывала противоположный ТГГ эффект, уменьшая количество интенсивно иммунореактивных клеток по Н3К9me2, meDNA, и увеличивая содержание Н3К4me2,3 (таблица). У прекондиционированных крыс (группа УГГ+ТГ) уровень иммунореактивности к Н3К9me2 и meDNA был снижен относительно контроля после ТГГ. Наряду с этим, отмечалось увеличение интенсивности метилирования Н3К4me2,3 на раннем сроке после ТГГ.

Таблица

Изменения количества клеток, иммунореактивных по Н3К9me2, Н3К4me2,3 и meDNA в ответ на действие ТГГ, УГГ и прекондиционированной ТГГ (УГГ+ТГГ) в неокортексе и гиппокампе крыс

	Н3К4me2,3				Н3К9me2				meDNA	
	неокортекс		гиппокамп		неокортекс		гиппокамп		неокортекс	
	II слой	V слой	CA1	CA3	II слой	V слой	CA1	CA3	II слой	V слой
ТГГ	280*	165*	22*	27*	625*	523*	389*	420*	444*	438*
УГГ	400*	273*	216*	319*	52*	77	54*	44*	50*	44*
УГГ+ТГГ	440*	477*	368*	242*	14*	39*	56*	38*	33*	12*

* — Отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

Таким образом, изменения содержания метилированных форм гистона H3 и метилированной ДНК, наблюдаемые в ответ на ТГГ, по современным представлениям, способствуют образованию гетерохроматина, что сопровождается подавлением транскрипции генов [2]. Это подтверждается нашими данными о том, что при ТГГ подавляется экспрессия Hif-1α, pCREB, NF-kappaB, а также проадаптивных белков Bcl-2, BDNF, EPO, что, очевидно, предопределяет структурные повреждения нейронов и их гибель [3]. Напротив, при действии умеренной гипоксии отмечается паттерн метилирования гистона H3 и ДНК, характерный для активации транскрипции, то есть способствующий образованию эухроматина. Аналогичные изменения наблюдаются и при использовании УТГ в качестве прекондиционирования.

Заключение. Интересно, что в нашем исследовании метилирование гистона H3K9 имело схожую тенденцию с метилированием ДНК и обратную корреляцию с метилированием гистона H3K4 при действии разных режимов гипоксии. Это согласуется с данными литературы. В частности, было обнаружено, что существует прямая корреляция между метилированием H3K9me2 и метилированием ДНК, тогда как при усилении метилирования H3K4me2,3, отмечается деметилирование ДНК [4]. Это можно объяснить наличием у них общих ферментов (метилтрансферазы и деметилазы) и общего сигнального белка HP (heterochromatin protein). HP является своеобразным связующим элементом, который распознает метилированные участки на поверхности как гистона H3, так и ДНК, а другим своим участком может связывать метилтрансферазу. Таким образом, метилирование гистонов и ДНК представляет собой связанный процесс регуляции активности генов, играющий важную роль, в том числе, и в формировании гипоксической толерантности мозга.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00516, программой ОФН.

Литература

1. Histone methylation regulates memory formation / Gupta S., Kim S. Y., Artis S., Molfese D. L., Schumacher A., Sweatt J. D., Paylor R. E., Lubin F. D. // J. Neurosci.— 2010.— Vol. 30.— P. 3589–3599.
2. *Johnson A. B., Denko N., Barton M. C.* Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription // Mutat. Res.— 2008.— Vol. 640.— P. 174–179.
3. *Самойлов М. О., Рыбникова Е. А.* Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.— 2012.— Т. 98, № 1.— С. 108–126.
4. *Cheng X., Blumenthal R. M.* Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation // Biochemistry.— 2010.— Vol. 49.— P. 2999–3008.

ВИРУСОЛОГИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ И КОАГУЛЯЦИОННЫЙ ГЕМОСТАЗ ПРИ КОМОРБИДНОСТИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЁГКИХ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА. ЕСТЬ ЛИ СВЯЗЬ?

Э. А. Абдуганиева, И. В. Ливерко
Ташкентская медицинская академия, Узбекистан

elnorahon@mail.ru

Согласно литературным данным 64% пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) имеют коронарный атеросклероз как коморбидную патологию [1]. Проблема коморбидности ишемической болезни сердца (ИБС) и ХОБЛ на сегодняшний день очень актуальна и не до конца изучена.

У ХОБЛ и ИБС общие факторы риска, как курение, урбанизация, низкая физическая активность, старение популяции, генетическая предрасположенность, при этих патологиях имеет место воспаление, как общий патогенетический механизм [2].

В исследованиях направленных на изучение патогенетической взаимосвязи ишемической болезни и ХОБЛ, выдвигаются гипотезы о том, что в основе взаимодействия лежат гипоксемия, эндотелиальная дисфункция, оксидативный стресс, цитокиновый дисбаланс, избыточная сосудистая ригидность. Между тем природа этих взаимосвязей при коморбидном течении ХОБЛ и ИБС не детализирована.

Вырабатываемые при воспалении фактор некроза опухоли альфа (TNF) и интерлейкин-1 бета (IL-1) являются одними из основных медиаторов, которые активируют коагуляцию путем стимуляции выработки тканевого фактора на поверхности эндотелия и моноцитов.

Кроме того, цитокины, особенно интерлейкин 6 (IL-6), может стимулировать образование тромбоцитов, которые обладают повышенной чувствительностью к тромбину и таким образом легко могут активировать каскад коагуляционных процессов.

Антикоагулянтные системы, роль которых в предотвращении тромбоза также важна, имеют в основном 3 механизма действия: выработка антитромбин-гепарин комплекса, активация ингибитора тканевого фактора и протеина С. Цитокины в основном воздействуют отрицательно на активацию протеина С и таким путем понижают антикоагулянтную способность крови, что создает еще более благоприятные механизмы для образования тромбов.

Целью исследования явилось изучение взаимосвязи провоспалительных и коагуляционных факторов у пациентов с коморбидностью ИБС и ХОБЛ.

Материалы и методы исследования. В основную группу вошли 20 пациентов с ИБС в форме стенокардии напряжения III–IV функциональных классов в сочетании с ХОБЛ средней степени тяжести. Пациенты имели клинико-инструментально подтвержденный диагноз ХОБЛ, согласно рекомендациям GOLD 2014, диагноз ИБС который устанавливался согласно Национальным рекомендациям ВНОК (2010) и МКБ. Средний возраст пациентов составил 63,1 лет, все пациенты были мужского пола. Контрольную группу составили 15 некурящих практически здоровых мужчин, сопоставимых по возрасту с пациентами основной группы.

У пациентов обеих групп исследовались маркеры воспаления: С-реактивный белок, IL-1, IL-6, из маркеров коагуляции был исследован фактор фон Виллебранда, из маркеров антикоагулянтной системы уровень протеина С.

Результаты исследования маркеров воспаления показали их высокий уровень в плазме пациентов — уровень С-реактивного белка был равен в среднем 17,4 мг/л (в контрольной группе 2,6 мг/л), уровень TNF-α был равен в среднем 9,8 пг/мл (в контрольной группе 1,75 пг/мл); уровень IL-1 составил в среднем 36,5 пг/мл (в контрольной группе 7,8 пг/мл), уровень IL-6 составил в среднем 67,8 пг/мл (в контрольной группе 5,3 пг/мл) соответственно. Показатель коагуляционного равновесия — фактор фон Виллебранда был равен 148,2 г/л в основной группе (8,5 г/л в группе контроля).

По уровню протеина С пациенты основной и контрольной группы распределились следующим образом: в основной группе умеренный дефицит (41–80%) протеина С установили у 17 (85%) пациентов, выраженный дефицит у 3 (15%) пациентов; в контрольной группе у всех пациентов был определен нормальный уровень протеина С в крови (⩾80%).

В результате полученных данных была установлена сильная прямая корреляционная связь между уровнем С-реактивного белка, IL-1, IL-6 и фактором фон Виллебранда, а также установлена прямая корреляционная связь между уровнем дефицита протеина С и повышением функционального класса стенокардии напряжения.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о повышенном уровне провоспалительных факторов и коагуляционных маркеров в крови у пациентов с коморбидностью ИБС и ХОБЛ, а также их взаимовлиянии. Сильная корреляционная связь, установленная в ходе исследования, может указывать на стимуляцию коагуляционных механизмов провоспалительными факторами в их прямой корреляционной взаимосвязи со степенью тяжести как ХОБЛ, так и ИБС. Возрастание системного воспаления при ХОБЛ повышает риск развития тром-

ботических осложнений у пациентов с сопутствующим коронарным атеросклерозом.

Литература

1. *Верткин А. Л., Скотников А. С., Губжокова О. М.* Коморбидность при хронической обструктивной болезни легких: роль хронического системного воспаления и клинико-фармакологические ниши рофлумиласта // Лечащий врач.— 2013.— № 9.— С. 143.
2. *Чучалин А. Г., Куценко М. А.* Парадигма коморбидности: синтропия ХОБЛ и ИБС // Русский медицинский журнал.— 2014.— № 5.— С. 389.

МЕХАНИЗМЫ ИДИОТИПИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ АУТОИММУННОЙ РЕАКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ИММУНИЗАЦИЕЙ АЛЛОАНТИГЕНОМ. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Н. Н. Абишева, И. В. Меньшиков
Удмуртский государственный университет, Ижевск, Россия

naidik84@mail.ru

Одним из ключевых механизмов регуляции аутореактивных лимфоцитов является иммунная сеть, основанная на идиотип-антиидиотипических (ИАИ) взаимодействиях лимфоцитов [1]. Однако, механизмы ее организации и функционирования до конца не ясны. Ранее нами была разработана математическая модель иммунной сети, включающая аутореактивные клоны [2]. Для экспериментальных исследований механизмов идиотипической регуляции аутореактивности удобной моделью является модель аутоиммунной гемолитической анемии (АГА) у мышей, вызываемая иммунизацией эритроцитами крыс (ЭК). Было показано, что между лимфоцитами специфичными к ЭК и аутореактивными антиэритроцитарными лимфоцитами у мышей существуют ИАИ взаимодействия и через эти взаимодействия происходит индукция аутореактивных антиэритроцитарных лимфоцитов в ответ на иммунизацию ЭК [2]. Одним из подходов для изучения механизмов иммунорегуляции является исследование поведения системы в условиях нарушения равновесия. Учитывая, что экспериментальные аутоиммунные заболевания могут быть индуцированы не только чужеродными антигенами, а также алло- и аутоантигенами, было исследовано поведение системы идиотипической регуляции аутореактивных антиэритроцитарных лимфоцитов в ответ на иммунизацию аллоэритроцитами.

Аллоэритроциты одной группе мышей вводили в иммуногенной дозе ($3{,}8\times10^8$ клеток), второй — в «ультранизкой» дозе ($1{,}5\times10^5$ клеток). Проводили сравнительный анализ уровня антиидиотипических антител (аутоантитела к эритроцитам мыши (ЭМ)), идиотипических антител (антитела к ЭК), количества эритроцитов в крови мыши.

Введение иммуногенной дозы аллоэритроцитов приводило к развитию транзиторной анемии с максимумом на 10-й день и восстановлением к 35-му дню после иммунизации. Иммунизация «ультранизкой» дозой аллоэритроцитов вызывала глубокую хроническую анемию. Падение эритроцитов в крови наблюдалось уже на 5-й день после начала иммунизации, их низкий уровень сохранялся в течение 35 дней наблюдения. Неожиданным также было появление высокого уровня антител специфичных к ЭК в ответ на введение иммуногенной дозы аллоэритроцитов. Повышение уровня антител к ЭК в ответ на иммунизацию «ультранизкой» дозой было незначительным.

Для объяснения феномена развития глубокой хронической анемии в ответ на введение «ультранизкой» дозы аллоэритроцитов, а также появления антител, специфичных к ЭК в ответ на иммунизацию аллоэритроцитами, была использована компьютерная модель иммунной сети, которая включала шесть идиотипически связанных клонов, замкнутых в кольцо. Клон 2 был задан как аутореактивный с помощью подачи постоянного сигнала. Клон 4 был задан как аллореактивный. Для этого на него был подан постоянный сигнал, но меньшей интенсивности, чем на аутореактивный клон. Исходное состояние иммунной сети было установлено как состояние толерантности. Имитирование введения аллоэритроцитов путем подачи однократного сигнала в некоторый момент времени на клон 4 не позволило добиться сходства результатов компьютерных исследований с экспериментальной кинетикой. Сходство теоретической и экспериментальной кинетики удалось получить при условии подачи однократного сигнала не только на аллореактивный клон 4, а также на клон 3.

Клон 3 при заданных условиях является клоном специфичным к чужеродному антигену и антиидиотипическим по отношению к ауто- и аллореактивному клону. Исходя из этого можно предполагать, что аллоантигены-индукторы аутоиммунных реакций активируют не только аллореактивные лимфоциты, но и оказывают прямое влияние на активность лимфоцитов антиидиотипических по отношению к ауто- и аллореактивным лимфоцитам. Кроме того, можно предполагать, что данный клон является регуляторным по отношению к аутореактивным лимфоцитам. Об этом свидетельствуют наблюдаемые в ответ на введение «иммуногенной» дозы аллоантигена высокая активность клона 3, реципрокность в изменении его активности и активности аутоклона (клона 2), ведущая к снижению активности аутоклона до исходного

состояния. И наоборот ассоциация между низкой активностью клона 3 и нерелаксирующей высокой активностью аутоклона в ответ на введение «ультранизкой» дозы.

В реальном объекте характеристикам регуляторного клона 3 удовлетворяют лимфоциты, специфичные к ЭК. Они так же, как клон 3, являются специфичными к чужеродному антигену и антиидиотипическими по отношению к аутореактивным лимфоцитам. Регуляторную роль антител к ЭК подтверждает факт развития хронической анемии при незначительном повышении уровня антител к ЭК в ответ на введение «ультранизкой» дозы аллоэритроцитов и транзиторный характер АГА при сильной продукции антител к ЭК в ответ на иммуногенную дозу аллоэритроцитов.

Таким образом, аллоантигены-индукторы аутоиммунных реакций активируют не только аллореактивные лимфоциты, но и напрямую активируют лимфоциты антиидиотипические по отношению к аутореактивным лимфоцитам. Слабая активация антиидиотипических лимфоцитов специфичных к аутореактивным лимфоцитам ведет к развитию хронической аутоиммунной реакции, сильная — вызывает транзиторную аутоиммунную реакцию. Причиной слабой активации являются низкие дозы аллоантигена.

Литература

1. *Coutincho A.* Will the idiotypic network helps to solve natural tolerance? // Trends Immunol.— 2003.— Vol. 24.— P. 53–54.
2. The idiotypic network in the regulation of autoimmunity. Theoretical and experimental studies / Menshikov I., Beduleva L., Frolov M., Abisheva N., Khramova T., Stolyarova E., Fomina K. // Journal of Theoretical Biology.— 2015.— Vol. 375.— P. 32–38.

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС СИНДРОМА (ОРДС), ВЫЗВАННОГО ВИРУСАМИ ГРИППА A/H1N1/PDM09 И A/H3N2 (A/AICHI/2/1968)

А. Г. Александров

Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

forphchemistry@gmail.com

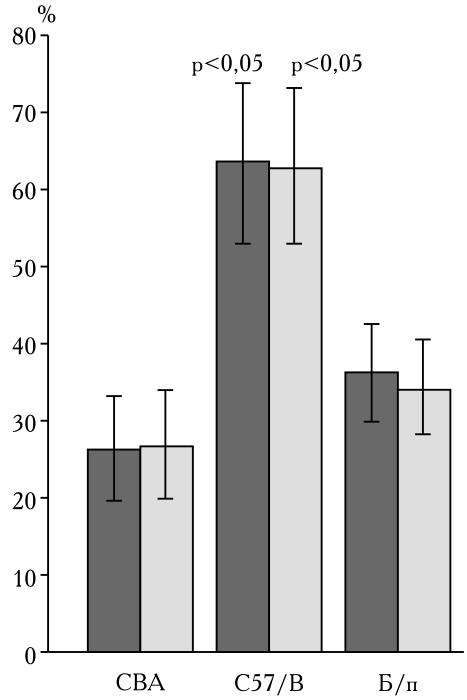
Введение. Одним из тяжелых вариантов течения гриппа является острый респираторный дистресс синдром (ОРДС), нередко заканчивающийся летальным исходом, что определяет актуальность поиска новых средств лечения данного вида патологии [1]. Сложную задачу, при этом, составляет выбор адекватной модели воспроизведения заболевания с целью тестирования потенциальных лекарственных средств в эксперименте. Наиболее широко в вирусологии в качестве тест-системы используются мыши самки.

Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение тяжести течения ОРДС при заражении вирусами гриппа A/H1N1/pdm09 и A/H3N2 (A/Aichi/2/1968) мышей различных линий.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на 85 мышах самках линий CBA, C57/Bl и белых беспородных, полученных из питомника «Рапполово» РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Эксперименты проведены согласно требованиям этического комитета ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. Определение летальных концентраций вирусов гриппа A/H1N1/pdm09 и A/H3N2 (A/Aichi/2/1968) было проведено на 40 беспородных мышах по методу Рида-Менча [2]. Действие каждого взятого разведения (от 10^{-2} до 10^{-5}) оценивали на 5 особях. Летальность животных регистрировали в течение 14-ти дней наблюдения, после чего рассчитывали LD50 по формуле:

$$LgLD50=L50=La+(Lb-La)\frac{50-a}{b-a},$$

где a — процент погибших мышей, полученный при титровании, ближайший к 50% снизу, b — процент погибших мышей, полученный при титровании, ближайший к 50% сверху, La и Lb — соответствующие дозы.



Примечание: * p<0,05 по сравнению с беспородными мышами и с мышами линии CBA.

Рисунок. Процент повреждения лёгочной ткани при ОРДС, вызванном вирусами гриппа подтипов A/H1N1pdm09 (ромбы) и A/H3N2 (A/Aichi/2/1968) (клетка).

ОРДС моделировали путём интраназального введения мышам различных линий 50 мкл вирусной суспензии штаммов A/H1N1/pdm09 и A/H3N2 (A/Aichi/2/1968) в дозах, равных LD50. Каждая экспериментальная группа содержала по 15 особей. Тяжесть течения ОРДС оценивали на 3-й день наблюдения, рассчитывая площадь повреждения (наличие очагов кровоизлияния) легочной ткани, по следующим критериям: 0% — отсутствие очагов кровоизлияния; 5% — единичные точечные кровоизлияния, 10% — очаг кровоизлияния в периферийной части одного лёгкого, 20% — очаги кровоизлияния в периферийной части обоих лёгких, 25% — очаг кровоизлияния, захватывающий четверть лёгкого, 50% — кровоизлияние на протяжении одного лёгкого или половины долей обоих лёгких, 100% — очаги кровоизлияния, захватывающие все доли обоих легких. Обработка полученных данных выполнена с использованием пакета статистических программ «Statistica 6.0» фирмы StatSoft (США). Отличия между выборками оценивали с помощью непараметрических критериев Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни и считали значимыми при уровне $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Расчетная величина LD50 штаммов вируса гриппа A/H1N1/pdm09 и A/H3N2 (A/Aichi/2/1968) составила 102,6 и 102,8, соответственно. Результаты, полученные при оценке степени повреждения легочной ткани, представлены на рисунке. Анализ полученных данных показал, что максимальное повреждение легочной ткани наблюдалось у мышей линии C57/Bl. В значительно меньшей степени этот процесс развивался у мышей линии CBA и у беспородных мышей. Тяжесть поражения легких у мышей линии C57/Bl, по-видимому, связана с особенностями их иммунного ответа на локальный процесс воспаления в легких, играющего значительную роль в этиопатогенезе ОРДС [3].

Заключение. Мыши линии C57/Bl являются оптимальной тест-системой для воспроизведения острого респираторного дистресс-синдрома, ассоциированного с вирусами гриппа A/H1N1/pdm09 и A/H3N2 (A/Aichi/2/1968).

Литература

1. The Burden of Influenza-Associated Critical Illness Hospitalizations / Ortiz J. R., Neuzil K. M., Shay D. K., Rue T. C., Neradilek M. B., Zhou H., Seymour C. W., Hooper L. G., Cheng P. Y., Goss C. H., Cooke C. R. // Crit. Care Med.— 2014.— Vol. 42, issue 11.— P. 2325–2332.
2. *Урбах В. Ю.* Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина, 1975.— 296 с.
3. *Pittet J. F, Mackersie R. C., Martin T. R., Matthay M. A.* Biological markers of Acute Lung Injury: Prognostic and pathogenetic significance //American Journal Respiratory Critical Care Medicine.— 1997.— Vol. 155, Issue 4.— P. 1187–1205.

ВЫЯВЛЕНИЕ IGM-АНТИТЕЛ К ПАРВОВИРУСУ B19 У БОЛЬНЫХ С ЭКЗАНТЕМНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НА ТЕРРИТОРИЯХ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА

А. Ю. Антипова, И. Н. Лаврентьева, М. А. Бичурина, Л. П. Сухобаевская, И. В. Хамитова

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Россия

anti130403@mail.ru

Парвовирусная инфекция (ПВИ), обусловленная парвовирусом B19 (*Primate Erythroparvovirus 1*, PVB19), широко распространена в РФ [1, 2]. Вирус передаётся воздушно-капельным путём, через кровь и от матери плоду. Регистрация случаев ПВИ в РФ не проводится. Истинный уровень заболеваемости не известен.

Целью работы стало изучение распространённости парвовирусной инфекции на территориях СЗФО в 2015 г.

На наличие IgM-антител к парвовирусу B19 (показатель острой инфекции) исследовали 336 сывороток крови от больных с экзантемными заболеваниями, отрицательных на корь и краснуху, поступивших в СПбРЦ по надзору за корью и краснухой с 11 территорий СЗФО в 2015 г. Применяли ИФА тест-систему «recomWELL Parvovirus B19 IgM» (MICROGEN GmbH, Германия) в соответствии с инструкцией.

Антитела класса IgM были обнаружены в 50 из 336 образцов (14,9±1,9%) на девяти из 11 территорий СЗФО. В 2015 г. ПВИ не выявлялась в Псковской области и Ненецком автономном округе. Наибольшее количество положительных образцов было получено из Ленинградской области — 22,2±6,9%. В Санкт-Петербурге и Калининградской области ПВИ выявлялась в 17,9±3,2% и 17,4±7,9% образцов, соответственно. В Республике Коми и Вологодской области показатель составил 11,1±5,2% и 10,0±5,5%, соответственно. В Мурманской, Новгородской, Архангельской областях и Республике Карелии были выявлены единичные случаи ПВИ. Случаи ПВИ наиболее часто определяются в мегаполисе и на приграничных территориях округа.

Иммуноглобулины класса M обнаружены у 35 из 209 (16,8%) больных с подозрением на инфекционные болезни. Доля образцов, содержащих IgM-антитела к PVB19, составила 23,6% (17 из 72 случаев) у больных с первичным диагнозом «краснуха, краснуха?», 17,4% (4 из 23 случаев) — «вирусная экзантема» и 8,9% (7 из 79) — ОРВИ/ОРЗ. Также ПВИ установлена у одного из семи человек с подозрением на корь. Парвовирусная инфекция клинически диагностирована только пяти больным, лабора-

торно подтвердилась у трёх (60%). Среди других диагнозов (иерсиниоз, ветряная оспа, внезапная экзантема и т.д.) ПВИ обнаружена в 13% образцов.

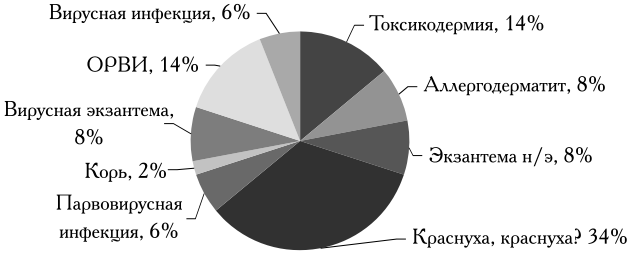


Рисунок. Структура первичных диагнозов у больных с лабораторно установленным диагнозом «парвовирусная инфекция».

В 30% случаев больным с лабораторно подтверждённой ПВИ был установлен первичный диагноз заболевания неинфекционной этиологии. IgM-антитела к PVB19 были выявлена у 15 из 127 (11,8%) пациентов со следующими диагнозами: «токсикодермия» — 7 из 24 (29,2%), «экзантема неясной этиологии» — 4 из 39 (10,3%) и «аллергодерматит» — 4 из 64 (6,3%) случаев (рисунок).

Ранее было показано [2], что ПВИ широко распространена на территориях СЗФО: за период с 2009–2012 гг. инфекция выявлялась на 9 из 11 территорий округа. Аналогичные данные получены в 2015 г. Клиническая диагностика ПВИ не улучшилась. В частности, у лиц с диагнозом «краснуха?» IgM-антитела к парвовирусу B19 выявлялись в 29,9% случаев в 2009–2012 гг. и в 4,3% случаев в 2015 г. Таким образом, было показано отсутствие существенных изменений в распространении ПВИ на территориях СЗФО. Показана актуальность данного исследования для практического здравоохранения.

Литература

1. Оценка распространения парвовирусной инфекции в Москве / Тихонова Н. Т., Герасимова А. Г., Москалева Т. Н., Цвиркун О. В., Чава О. О., Садыкова Д. К., Филатов Н. Н., Лыткина И. Н., Миронова В. Ф.// Информационное письмо Комитета здравоохранения г. Москвы.— М., 2004.— № 11.— 12 с.
2. *Антипова А. Ю., Лаврентьева И. Н., Бичурина М. А., Семенов А. В.* Лабораторная диагностика парвовирусной инфекции в системе эпидемиологического надзора за экзантемными заболеваниями // Эпидемиология и вакцинопрофилактика.— 2012.— № 2 (63).— С. 26–29.

ОЦЕНКА ИНТЕГРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННЫМ ЭНДОКАРДИТОМ

И. И.Бадыков, А. В.Шестакова, А. П.Годовалов, Б. К.Кадыралиев
Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е. А. Вагнера Министерства здравоохранения РФ, Россия

badykov.ilnar@yandex.ru

Введение. В развитии инфекционного эндокардита (ИЭ) основную роль играют такие факторы как бактериемия, травма эндокарда и изменения иммунного реагирования [1]. При ИЭ происходит накопление большого количества токсических веществ микробного генеза [2], превышающих возможности обезвреживающих систем организма. Для оценки степени эндогенной интоксикации предложено использовать ряд интегральных гематологических индексов, которые служат маркерами иммунологической реактивности организма [3]. Несмотря на активное изучение дисфункций, возникающих при системном воспалении, данные, характеризующие механизмы их развития, остаются немногочисленными, особенно в отношении иммунокомпрометированных пациентов с ИЭ [4].

Цель исследования. Изучение интегральных показателей эндогенной интоксикации, фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови пациентов с ИЭ.

Материалы и методы исследования. В исследовании приняли участие 16 пациентов с установленным диагнозом ИЭ и 26 практически здоровых доноров. Пробы периферической крови получали утром, натощак. Общее число лейкоцитов подсчитывали в камере Горяева, а состав лейкоцитов периферической крови изучали путем приготовления препаратов для микроскопии, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Степень эндогенной интоксикации оценивали, рассчитывая лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) по формуле Я. Я. Кальф-Калифа, а также индекс резистентности организма (ИРО), реактивный ответ нейтрофилов (РОН) и индекс сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК) [3]. Для изучения фагоцитарной активности клеток периферической крови использовали методику [5] в модификации [6]. В качестве объекта фагоцитоза использовали живые клетки *Candida albicans*. Активность фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов анализировали дифференцированно. Для статистической обработки данных использовали непарный вариант t-критерия Стьюдента, за пороговый уровень значимости принимали величину $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. В ходе проведенных исследований было установлено, что у пациентов с ИЭ наблюдается лейкоцитоз за счет увеличения количества палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, а также

относительная моноцитопения и лимфоцитопения. При ИЭ показатель ЛИИ составил 2,7±0,5, а в контроле — 0,7±0,1 (p<0,05), что указывает на нарастание эндогенной интоксикации, активации тканевого распада. ИРО у пациентов с ИЭ — 162,7±27,1, а в контроле — 609,9±70,5 (p<0,05), что является отражением возможного развития инфекционных осложнений. В группе пациентов с ИЭ наблюдался ряд осложнений: пневмония (50%), миокардит (37%), гломерулонефрит (22%), менингит (5%) и абсцесс селезенки (3%). Индекс РОН в группе пациентов был 14,6±4,1, а в контроле — 3,0±0,5 (p<0,05). Известно, что увеличение индекса РОН до 15–25 указывает на компенсирование эндогенной интоксикации. ИСЛК при инфекционном эндокардите составил 3,3±0,4 (в контроле — 1,3±0,05; p<0,05), что свидетельствует об активном воспалительном процессе и нарушении иммунологической реактивности.

При ИЭ наблюдается увеличение фагоцитарной активности клеток периферической крови в отношении *C. albicans*. Так, число нефагоцитирующих лейкоцитов у пациентов составило 71,9±3,6% (в контроле — 92,4±0,8%; p<0,05). Основной вклад в фагоцитоз при ИЭ вносят нейтрофилы (92,2±3,2%). У пациентов с ИЭ увеличено количество нейтрофилов, поглощающих от 1 до 3 клеток *C. albicans*. Фагоцитарное число при ИЭ составило 1,9±0,4 (в контроле — 1,1±0,05; p<0,05). Кроме этого, статистически значимыми при эндокардите являются активно-фагоцитирующие нейтрофилы (8,8±2,2%, в контроле — 0,6±0,5%; p<0,05). Роль фагоцитарной активности мононуклеарных клеток у пациентов с ИЭ существенно меньше: их моноциты фагоцитировали не более 2 клеток *C. albicans*.

В целом, в проведенном исследовании установлено, что для инфекционного эндокардита характерна компенсированная эндогенная интоксикация, обусловленная накоплением продуктов микробного метаболизма в большей степени [2]. В результате наблюдается активация факторов и механизмов врожденного иммунитета и, в первую очередь, фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов. Однако, синдром эндогенной интоксикации развивается и негативно влияет на состояние организма, способствует формированию осложнений.

Заключение. Инфекционный эндокардит характеризуется выраженным лейкоцитозом, а также активацией тканевого распада, который приводит к формированию компенсированной эндогенной интоксикации. При инфекционном эндокардите установлена активация процесса фагоцитоза нейтрофилами *C. albicans*.

Литература

1. *Виноградова Т. Л.* Инфекционный эндокардит: современное течение // Клиницист.— 2011.— № 3.— С. 4–9.
2. *Thiene G., Basso C.* Pathology and pathogenesis of infective endocarditis in native heart valves // Cardiovasc. Pathol.— 2006.— Vol. 15.— P. 256–263.
3. *Мустафина Ж. Г., Крамаренко Ю. С., Кобцева В. Ю.* Интегральные гематологические показатели в оценке иммунологической реактивности организма у больных с офтальмопатологией // Клин. лаб. диагностика.— 1999.— № 5.— С. 47–48.
4. *Bustamante J., Arévalo A., Tamayo E. et al.* Cytokine profiles linked to fatal outcome in infective prosthetic valve endocarditis // APMIS.— 2013.— Vol. 122 (6).— P. 526–529.
5. *Каплин В. Н., Кузнецов В. Ф., Обернебесова Т. П.* Методические аспекты изучения фагоцитоза // I съезд иммунологов России: Тезисы докладов.— Новосибирск, 1992.— С. 200–201.
6. *Шилов Ю. И., Орлова Е. Г.* Адренергическая регуляция функций циркулирующего пула фагоцитирующих клеток при остром стрессе // Докл. Академии наук.— 2000.— Т. 373, № 2.— С. 267–269.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА FLICVP6VP8

Е. Г. Богомолова, Е. А. Фёдорова, И. В. Духовлинов, А. С. Симбирцев

Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

bogomolovaele@inbox.ru

Введение. Ротавирусы являются одной из ведущих причин возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у детей младшего возраста. Ротавирусы повреждают энтероциты, расположенные на микроворсинках тонкого кишечника, что приводит к снижению абсорбции и диарее. Иммунитет к ротавирусной инфекции нестойкий, поэтому заболевание может повторяться в течение жизни. Невосприимчивость у переболевших обусловлена формированием не только IgM и IgG, но и IgA антител. В настоящее время самым эффективным способом борьбы с ротавирусной инфекцией считается своевременная вакцинация. Лицензированные противоротавирусные вакцины основаны на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого и/или животного происхождения, которые размножаются в кишечнике человека. Активный агент кандидатной вакцины — белок FliCVP6VP8 — включает фрагмент белка VP6, фрагмент белка VP8 ротавируса А, а также компоненты флагеллина *Salmonella typhimurium* FliC в качестве адъюванта [1], компоненты соединены гибкими мостиками. Представленные фрагменты являются

консервативными частями белков VP6 и VP8, к которым в процессе естественной инфекции образуются специфичные антитела [2].

Цель исследования: изучение эффективности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного FliCVP6VP8 на модели ротавирусной инфекции на лабораторных мышах.

Объекты, материалы и методы. В качестве препарата сравнения использовали коммерческую вакцину Rotarix® (GlaxoSmithKline), в качестве контрольного вещества — физиологический раствор. В экспериментах использовали самок мышей линии BALB/c 9–12-недельного возраста. Препарат кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции и контрольное вещество животным вводили в квадрицепс левой конечности в объеме 500 мкл, коммерческую вакцину — перорально. Иммунизацию осуществляли однократно, либо двукратно с интервалом в 14 суток. Для заражения был использован штамм EDC ротавируса мышей, депонированный в Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского под номером ГКВ М 2113. Выявление ротавирусного антигена, а также определение уровня специфичных антител в сыворотках крови и смывах кишечника осуществляли методом ИФА.

Результаты и их обсуждение. По результатам проведенных исследований протективности разработанную кандидатную вакцину на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 можно охарактеризовать как эффективную в плане защиты от ротавирусной инфекции. Животные, дважды иммунизированные кандидатной вакциной и впоследствии зараженные ротавирусом EDC, характеризовались уровнем определяемого ротавирусного антигена в фекалиях <10 нг/мл, также как и животные, иммунизированные коммерческой вакциной. Полная защита от мышиного ротавируса после его перорального введения иммунизированным кандидатной вакциной животным ассоциировалась с продукцией вирусспецифичных IgA в кишечнике животных и в сыворотке крови, а также вирусспецифичных IgG в этих же биосубстратах. При двукратном применении кандидатная вакцина эффективнее, нежели в случае ее однократного введения. Результаты исследований различных групп ученых показали, что VP6-специфичные антитела имеют прямую противоротавирусную активность. Нейтрализующая активность проявляется за счет ингибирования процесса репликации вирусов [3]. Установлено, что иммунизация лабораторных мышей кандидатной вакциной, активным агентом которой является капсидный белок ротавируса VP6, вызывает формирование протективного иммунного ответа против последующего заражения животных штаммом мышиного ротавируса EDIM [4]. Эти данные согласуются с результатами, полученными в данной работе — наблюдается формирование нейтрализующих IgG и IgA антител как в сыворотке крови, так и на слизистой кишечника, также существенно снижается выделение ротавирусного антигена с фекалиями иммунизированных животных после заражения. Кандидатная вакцина на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8 имеет преимущество по сравнению с вакциной на основе полноразмерного белка VP6. Использование антигенных эпитопов позволяет создать более активный и универсальный иммуноген, обеспечивающий перекрестную защиту против различных штаммов ротавируса.

Заключение. Полученные результаты говорят о целесообразности проведения дальнейших доклинических испытаний кандидатной противоротавирусной вакцины на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8.

Литература

1. *Balaram P., Kien P. K., Ismail A.* Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections // Int. J. Med. Microbiol.— 2009.— Vol. 299, № 3.— P. 177–185.
2. *Gil M. T., de Souza C. O., Asensi M., Buesa J.* Homotypic protection against rotavirus-induced diarrhea in infant mice breast-fed by dams immunized with the recombinant VP8* subunit of the VP4 capsid protein // Viral Immunol.— 2000.— Vol. 13, № 2.— P. 187–200.
3. *Aiyegbo M. S., Sapparapu G., Spiller B. W., Eli I. M., Williams D. R., Kim R., Lee D. E., Liu T., Li S., Woods V. L. Jr. et al.* Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore. PLoS One. 2013.— Vol. 8.— P. 61101
4. *Lappalainen S., Pastor A. R., Tamminen K., López-Guerrero V., Esquivel-Guadarrama F., Palomares L. A., Vesikari T., Blazevic V.* Immune responses elicited against rotavirus middle layer protein VP6 inhibit viral replication in vitro and in vivo // Human Vaccines & Immunotherapeutics.— 2014.— Vol. 10, № 7. P. 2039–2047.

ИММУНИЗАЦИЯ ДОМАШНИХ УТОК ЖИВЫМ НЕПАТОГЕННЫМ ВИРУСОМ ГРИППА H5N3 ПРЕДОТВРАЩАЕТ ЦИРКУЛЯЦИЮ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА H5N1

[1]Е. Ю.Боравлёва, [1]И. В.Гордейчук, [2]А. В.Луницын, [1]А. С.Гамбарян

[1]Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН, Москва, Россия

[2]Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии, Покров, Россия

elisa13@yandex.ru

Введение. Основными хозяевами вирусов гриппа А являются дикие водоплавающие птицы, в первую очередь — утиные. В утках вирус размножается в кишечнике и передаётся преимущественно фекально-оральным путём

через контаминированную воду [1]. В редких случаях вирус адаптируется к новому хозяину и продолжает циркулировать в нём, образуя стабильную эволюционную линию. Вирусы гриппа диких птиц тысячелетиями подвергались стабилизирующему естественному отбору по признаку авирулентности. Лишь в противоестественных условиях птицеводческих ферм с круглогодичной скученностью птицы повышение вирулентности перестает быть препятствием для распространения вируса. Адаптация к курам, как правило, сопровождается усилением патогенности [2].

Несмотря на все усилия контролирующих организаций и научной общественности, вирус H5N1 остаётся важнейшей проблемой развивающихся стран Азии и Африки. Годы кажущегося затишья сменяются годами возрастающего числа вспышек на птицефермах и возрастающего числа человеческих жертв (www.cdc.gov).

Стратегия борьбы, заключающаяся в полном искоренении домашних птиц в районах вспышек и превентивной вакцинации птицы инактивированными вакцинами в зонах риска, оказывается неэффективной. Инактивированные вакцины защищают птиц, однако плохо препятствуют распространению вируса [3]. Распространение высокопатогенных вирусов представляет не только основную «головную боль» птицеводства, но и не до конца прояснённый вопрос вирусологии. Основным хозяином и главными жертвами высокопатогенных H5N1 вирусов являются куры; но кто же переносит вирус от фермы к ферме? [4, 5]

Представляется вероятным, что эффективнее всего работает цепочка дикие утки — домашние утки — куры. Проблема в том, что H5N1 вирус, смертельный для кур, вызывает у уток бессимптомную инфекцию, и поэтому занос вируса будет оставаться незамеченным до тех пор, пока не начнётся падёж кур. Прерывание цепочки на стадии домашних уток могло бы затормозить распространение вируса.

Материалы и методы исследования. Ранее мы описали эффективность вакцинации кур живым апатогенным H5N3 вирусом [6]. В настоящей работе мы изучали эффективность вакцинации уток этим же вирусом и влияние вакцинации уток на возможность переноса H5N1 вируса от уток к курам.

На первой стадии опыта уток инфицировали орально либо апатогенным вирусом диких уток A/duck/Moscow/4182/2010 (d/4182), либо высокопатогенным вирусом кур A/chicken/Kurgan/3/2005 (ch/Ku). Через два дня к утками помещали недельных цыплят. За птицами вели наблюдение и ежедневно собирали фекалии от уток. Через три недели после инфицирования уток у всех птиц брали образцы крови для определения антител.

Вторая стадия опыта. Через месяц после первичного инфицирования уток повторно инфицировали высокопатогенным вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005. Через два дня к ним подсадили новых недельных цыплят и полностью повторили ход эксперимента первой стадии.

Результаты и их обсуждение. Цыплята, помещённые с утками, инфицированными вирусом d/4182 не проявляли признаков заболевания и не содержали антител к вирусам гриппа H5. В том случае, когда утки были первично инфицированы вирусом ch/Ku, все контактные цыплята погибли на 9–15-й день после подсадки.

Во второй стадии эксперимента, когда утки были инфицированны вирусом ch/Ku через месяц после первичного заражения вирусом d/4182, цыплята не проявляли признаков заболевания, не выделяли вирус с фекалиями и не содержали антител к вирусам гриппа H5.

Заключение. Таким образом, мы показали, что утки, орально вакцинированные вирусом d/4182, при последующем заражении вирусом H5N1 не выделяют его в окружающую среду и становятся безопасными в этом отношении. Такая вакцинация уток в небольших домашних хозяйствах могла бы подавить распространение высокопатогенных H5N1 вирусов. Дешевизна и простота производства являются дополнительными преимуществами такой вакцины.

Благодарности. Авторы выражают благодарность д.б.н. С. С. Ямниковой — за предоставление штамма A/chicken/Kurgan/3/2005.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00547-а.

Литература

1. Evolution and ecology of influenza A viruses / Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y. // Microbiological Reviews.— 1992.— Vol. 56.— P. 152–179.
2. *Matrosovich M. N., Zhau N., Kawaoka Y., Webster R.* The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties // J. Virol.— 1999.— Vol. 73.— P. 1146–1155.
3. *Spackman E., Swayne D. E.* Vaccination of gallinaceous poultry for H5N1 highly pathogenic avian influenza: Current questions and new technology // Virus Research.— 2013.— Vol. 178 (1).— P. 121–132.
4. Global patterns of influenza a virus in wild birds / Olsen B., Munster V. J., Wallensten A., Waldenström J., Osterhaus A. D., Fouchier R. A. // Science (New York, N.Y.).— 2006.— Vol. 312 (5772).— P. 384–388.
5. *Kim J. K., Negovetich N. J., Forrest H. L., Webster R. G.* Ducks: The «Trojan Horses» of H5N1 influenza // Influenza and other Respiratory Viruses.— 2009.— Vol. 3 (4).— P. 121–128.
6. Испытание апатогенного H5N3 вируса дикой утки в качестве ветеринарной живой вакцины против гриппа H5N1 / Боравлева Е. Ю., Чвала И. А., Ломакина Н. Ф., Репин П. И., Мудрак Н. С., Руденко Л. Г., Гамбарян А. С., Дрыгин В. В. // Вопросы вирусологии.— 2015.— Т. 60 (4).— С. 44–49.

РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСА ГРИППА A(H1N1)PDM09 В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ

А. Д.Васильева, Д. М. Даниленко, Н. И. Коновалова, П. А. Петрова, М. Ю. Еропкин, А. И. Желтухина, Е. Г. Корнилова

Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

nastasya_vasileva_94@mail.ru

Вирус гриппа обладает выраженным высоким уровнем изменчивости. Выделение вирусов гриппа позволяет изучить антигенные и генетические свойства возбудителей, провести филогенетический анализ и определить направления эволюционной изменчивости [1].

Вирус гриппа выделяется на различных клеточных системах. Современные стандарты Всемирной Организации Здравоохранения рекомендуют использовать клеточную линию MDCK и куриные эмбрионы. Исследователями было отмечено, что в процессе вирусовыделения на куриных эмбрионах вирусы приобретают различные генетические изменения, поэтому наиболее перспективным направлением является использование клеточных культур. Так как культивирование клеток лежит в основе изоляции вирусов, подбор клеточных линий и оптимальных условий, при которых выделение вируса будет проходить наиболее эффективно, является важным и основополагающим моментом для успешного выделения и характеристики свойств вируса гриппа.

Проведено исследование по оценке пермиссивности перевиваемых культур клеток человеческого и животного происхождения для вирусов гриппа A(H1N1)pdm09. Были отобраны клеточные линии, которые пригодны для вирусовыделения с целью их дальнейшего возможного использования в качестве модели при изучении гриппозной инфекции *in vitro*. Выделение проводилось на культурах клеток животного происхождения (MDCK, Vero) и человеческого происхождения (A-549, CaCo2, ECV-304, ФЛЭЧ, MeWo, RD). В качестве исследуемых вируссодержащих материалов были использованы мазки из носа, взятые у больных гриппом в 2015 и 2016 гг., в которых присутствие РНК вируса гриппа A(H1N1)pdm09 было подтверждено в полимеразной цепной реакции.

Наиболее пермиссивной для вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 перевиваемой клеточной культурой человеческого происхождения оказалась культура клеток CaCo-2, которая была сравнима по своей чувствительности с эталонной линией MDCK, а так же куриными эмбрионами при выделении вирусов гриппа [2].

Клеточные культуры A-549, Vero и RD также пригодны к использованию при выделении вирусов гриппа в экспериментальных условиях, однако стоит учитывать тот факт, что выделяемые вирусы обладают низкими показателями инфекционной и гемагглютинирующей активности, которые не удается увеличить в ходе последовательных пассажей. Культуры клеток ECV-304, ФЛЭЧ, MeWo не представляются перспективными для работ по выделению вирусов гриппа, так как вирусовыделение на них происходило неэффективно.

Антигенный анализ штаммов, выделенных на разных клеточных линиях, показал однородность антигенных характеристик изученных вирусов и отсутствие изменений, влияющих на эти характеристики, что исключительно важно для дальнейшего анализа эволюционных тенденций циркулирующих вирусов гриппа человека.

Использование клеточных линий различных типов и происхождения (клетки кожи, легкого, ободочной кишки, эндотелия, мышечной ткани и др.) позволит изучать различные аспекты патогенеза гриппозной инфекции в условиях *in vitro*.

Литература

1. *Коновалова Н. И.* Эволюционная изменчивость вирусов гриппа А, циркулировавших в России в 1997–2007 гг.: дис. … канд. мед. наук.— СПб., 2009.— 186 с.: ил.
2. *Даниленко Д. М., Смирнова Т. Д., Гудкова Т. М.* Сравнительное изучение эффективности использования клеточных линий MDCK и CaCo-2 для выделения вирусов гриппа // Вопр. вирусологии.— 2014.— Т. 59, № 2.— С. 40–45.

ЭНДОГЕННЫЙ МЕЛАТОНИН В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Th17 ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

[1]Н. С. Глебездина, [1]И. В. Некрасова, [2]А. А. Олина, [1]Е. М. Куклина

[1]Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь, Россия

[2]Пермский государственный медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера Министерства здравоохранения РФ, Россия

glebezdina_n@mail.ru

Введение. Эпифизарный гормон мелатонин вовлечен в контроль многих физиологических функций организма, в том числе процессов репродукции. За счет высокой антиоксидантной активности он рассматривается в настоящее время как перспективный препарат для предупреждения ряда осложнений в развитии беременности, в частности,

преэклампсии [1, 2]. В то же время, гормон способен эффективно регулировать функции клеток иммунной системы, в первую очередь — $CD4^+$ Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-17 (Th17), поскольку один из двух ключевых факторов дифференцировки Th17, RORα, служит одновременно одним из рецепторов для мелатонина [3]. Учитывая ключевую роль субпопуляции Th17 в развитии беременности, ее регуляция мелатонином в этот период представляет особый интерес.

Цель настоящей работы — оценка роли эндогенного мелатонина в регуляции дифференцировки Th17 при беременности.

Материалы и методы. Объектами исследования служили лейкоциты женщин, находящихся в I триместре беременности, как наиболее критичном в плане индукции спонтанных абортов, а также лейкоциты здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста. В работе использовали суспензию мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (1,077 г/см^3), и фракционированные методом иммуномагнитной сепарации («R&D Systems», США) $CD4^+$ Т-лимфоциты на фоне стандартной поликлональной активации (анти-CD3/CD28, «Invitrogen», США). Вклад эндогенного мелатонина определяли при культивировании лимфоцитов в присутствии аутологичной сыворотки на фоне блокады мелатонин-зависимых сигналов с использованием лузиндола («R&D Systems», США) — ингибитора мембранного мелатонинового рецептора (MT). Уровень $CD4^+ROR\gamma t^+$ Т-лимфоцитов оценивали как ex vivo, так и после 48 ч культивирования методом проточной цитометрии с использованием соответствующих моноклональных антител для поверхностного и внутриклеточного окрашивания («Novus Biologicals», США). При этом устанавливали процент $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих RORγt, и уровень экспрессии на клетках данного транскрипционного фактора, определяемый как средняя интенсивность свечения (Middle Fluorescence Intensity, MFI; условные единицы). Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флюоресценции лимфоцитарного окна использовали соответствующие изотипические контроли. Статистический анализ проводили с использованием парного и непарного t-критерия Стьюдента, непараметрических критериев Вилкоксона и Манна-Уитни.

Показано, что уровень $CD4^+ROR\gamma t^+$ Т-клеток, оцениваемый ex vivo, не отличался в группах беременных I триместра и небеременных женщин (процент $CD4^+ROR\gamma t^+$ Т-клеток у небеременных: 1,48±0,09, у беременных: 1,63±0,20; $p<0,05$). При этом обнаружены достоверные отличия между группами по MFI (небеременные — 20,37±0,87, беременные — 26,63±2,51; $p<0,05$).

По результатам 48-часовой активации в присутствии аутологичной сыворотки установлено повышение процента $CD4^+ROR\gamma t^+$ Т-клеток как у небеременных (2,55±0,17; $p<0,05$) женщин, так и в группе беременных (2,84±0,33; $p<0,05$). При этом уровень экспрессии RORγt в $CD4^+$ Т-лимфоцитах в группе небеременных также возрастал (MFI: 26,24±0,91; $p<0,05$), а в группе беременных наоборот снижался (MFI: 21,25±0,78; $p<0,05$ — по сравнению с ex vivo и группой небеременных).

На фоне блокады мелатонин-зависимых сигналов процент $CD4^+ROR\gamma t^+$ Т-клеток снижался практически до уровня, сравнимого с исходным (*ex vivo*): небеременные — 1,60±0,15; $p<0,05$, беременные — 1,19±0,15; $p<0,05$. Степень экспрессии RORγt в $CD4^+$ Т-лимфоцитах беременных женщин при внесении ингибитора наоборот возрастала (MFI: 23,89±1,08; $p<0,05$ — по сравнению с 48 часовой активацией и группой небеременных). В то же время в группе небеременных интенсивность свечения RORγt осталась практически неизменной (MFI: 28,07±0,40; $p>0,05$).

Результаты и их обсуждение. Таким образом, хотя процент Th17 клеток у женщин, находящихся в I триместре беременности, и небеременных женщин не отличался как ex vivo, так и после 48 часовой активации, при исследовании такого показателя, как MFI RORγt, выявлены интересные различия. Так, при активации Т-лимфоцитов в группе небеременных MFI растет параллельно с увеличением процента $CD4^+ROR\gamma t^+$ клеток, а в группе беременных снижается. Несмотря на то, что действие мелатонина через поверхностный рецептор MT при исследовании процента $CD4^+ROR\gamma t^+$ лимфоцитов выявлено в обеих исследуемых группах, участие данного гормона в регуляции MFI установлено лишь в группе беременных, так как под действием лузиндола степень экспрессии RORγt в группе небеременных не менялась. Вероятно, это может быть связано с вовлечением внутриклеточного рецептора для гормона — RORα.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60094 мол_а_дк.

Литература

1. *Lanoix D., Guerin P., Vaillancourt C.* Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy // J. Pineal Res.— 2012.— Vol. 53 (4).— P. 417–425.
2. Phase I pilot clinical trial of antenatal maternally administered melatonin to decrease the level of oxidative stress in human pregnancies affected by pre-eclampsia (PAMPR): study protocol / Hobson S. R., Lim R., Gardiner E. E., Alers N. O., Wallace E. M. // BMJ Open.— 2013.— Vol. 3 (9).— e003788.
3. *Куклина Е. М., Глебездина Н. С., Некрасова И. В.* Роль мелатонина в контроле дифференцировки Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-17 (Th17) // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.— 2015.— Т. 160, № 11.— С. 604–607.

ВЛИЯНИЕ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* НА БАКТЕРИЦИДНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ

А. С. Головин, Э. А. Старикова, И. С. Фрейдлин
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

grandkruz@ya.ru

Введение. Макрофаги играют важную роль на всех стадиях воспалительного процесса. Поляризация макрофагов (классическая и альтернативная) определяется, по крайней мере частично, балансом между активностью аргиназы и индуцированной NO-синтазы (iNOS), субстратом для которых является аргинин. Продуцируемые в результате активности аргиназы пролин и полиамины участвуют в процессах регенерации. Действие iNOS, связанное с продукцией оксида азота (NO), направлено на борьбу с патогенами [1]. Стрептококки группы А (*Streptococcus pyogenes*) — это грам-положительные бактерии, экспрессирующие фермент аргининдеиминазу (АД), который метаболизирует аргинин [2]. Активность этого фермента может приводить к дефициту субстрата для аргиназы и iNOS и дизрегуляции функций макрофагов [3].

Цель данного исследования состояла в изучении влияния АД *Streptococcus pyogenes* на продукцию NO перитонеальными макрофагами мыши.

Материалы и методы исследования. Мыши гибридной породы CBA/BALB (F1) содержались и использовались в соответствии с принятыми этическими нормами. В работе использовали супернатанты разрушенных ультразвуком *S.pyogenes* M49–16wt и его изогенного мутанта с делецией гена АД M49–16delAD (любезно предоставленные д.м.н., проф. Суворовым А. Н. и д.м.н. Буровой Л. А., отдел молекулярной микробиологии, ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург) содержащие биологически активные внутриклеточные компоненты бактерий. Проводили сравнительный анализ влияния супернатантов разрушенных M49–16wt и M49–16delAD на продукцию NO клетками перитонеального лаважа мыши, которые получали промыванием брюшной полости мышей стерильным раствором Хенкса. Клетки вносили в 96-и луночный планшет (Eppendorf) в количестве 300 тысяч клеток в 100 мкл среды RPMI 1640 (Биолот) с 10% сыворотки Flow. После чего в лунки планшета вносили супернатант *S.pyogenes* M49–16wt или M49–16delAD, в разведении 6 мкл/100 мкл среды. Для изучения влияния АД на индуцированную продукцию NO в лунки вносили липополисахарид (LPS) в концентрации 100 нг/мл. В часть лунок добавляли аргинин в концентрации 2 мМ/мл. После 24-х часовой инкубации (37° С, 5% CO_2) производили осаждение клеток центрифугированием, 80 мкл надосадка переносили в 96-луночный планшет (Eppendorf). Продукцию NO определяли по концентрации нитратов и нитритов в надосадках с помощью реактива Грисса, с последующей спектрометрией (Microplate reader, Model 680, Bio-Rad). Статистическую обработку данных проводили в программе STATISTICA 5.0 при помощи t-теста Стьюдента для независимых выборок.

Результаты и их обсуждение. Исследования показали, что супернатант *S.pyogenes* M49–16wt достоверно на 65% ($p<0,001$) подавлял спонтанную продукцию NO клетками перитонеального лаважа. При добавлении экзогенного аргинина происходило достоверное усиление на 28% ($p<0,05$) продукции NO, подавленной под влиянием супернатанта *S.pyogenes* M49–16wt. При этом инкубация клеток в присутствии супернатанта *S.pyogenes* M49–16delAD не изменяла продукцию NO клетками как при добавлении экзогенного аргинина, так и без него. Инкубация клеток перитонеального лаважа в присутствии LPS приводила к достоверному усилению в полтора раза ($p<0,001$) продукции NO по сравнению с уровнем спонтанной продукции. Продукция NO, индуцированная под влиянием LPS, достоверно снижалась на 40% ($p<0,01$) в присутствии супернатанта *S.pyogenes* типа M49–16wt. Добавление экзогенного аргинина приводило к достоверному усилению на 60% ($p<0,01$) продукции NO, по сравнению с продукцией NO в присутствии S.pyogenes типа M49–16wt. Супернатант *S.pyogenes* M49–16delAD не оказывал достоверного влияния на продукцию NO клетками перитонеального лаважа, индуцированную под действием LPS. Однако, при добавлении экзогенного аргинина, продукция NO в присутствии LPS была достоверно выше, чем продукция NO в присутствии супернатант *S.pyogenes* M49–16delAD и LPS.

Заключение. Супернатант *S.pyogenes* M49–16wt подавлял спонтанную и индуцированную LPS продукцию NO. Супернатант его изогенного мутанта с делецией гена АД таким действием не обладал. Добавление экзогенного аргинина приводило к усилению спонтанной и индуцированной LPS продукции NO, подавленной под влиянием *S.pyogenes* M49–16wt, но не оказывало никакого влияния на продукцию NO клетками, инкубированными в присутствии мутанта с делецией гена АД. Полученные результаты свидетельствуют о способности стрептококковой АД вызывать дефицит продукции NO клетками перитонеального лаважа за счет деплеции субстрата iNOS.

Литература

1. *Mills C. D.* M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. // Crit Rev Immunol.— 2012.— Vol. 32.— P. 463–88.
2. Biochemical and biological activity of arginine deiminase from Streptococcus pyogenes M22 / Starikova E. A., Sokolov A. V., Vlasenko A. Y., Burova L. A., Freidlin I. S., Vasilyev V. B. // Biochem Cell Biol.— 2016 Apr.— Vol. 94 (2).— P. 129–37.
3. *Cusumano Z. T., Watson M. E., Caparon M.* G. Jr. Streptococcus pyogenes Arginine and Citrulline Catabolism Promotes Infection and Modulates Innate Immunity // Infect. Immun.— January 2014.— Vol. 82, № 1.— P. 233–242.

АНАЛИЗ ЧАСТОТ МУТАЦИЙ В ГЕНОМЕ ВИЧ-1 СУБТИПА А В ОБЛАСТЯХ, СОДЕРЖАЩИХ ЭФФЕКТИВНЫЕ МИШЕНИ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

М. А. Горбачева, И. Р. Алембеков, Д. М. Федосеева, Д. В. Сосин, О. В. Кретова, Н. А. Чуриков
Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

maruseok@gmail.com

Оценивали средние частоты мутаций в областях генома ВИЧ-1, содержащие эффективные мишени РНК-интерференции в популяции вирусов у больных в России. Частоты мутаций в окрестности мишеней и непосредственно в самих мишенях были примерно одинаковы. Как известно, частоты мутаций в разных позициях кодонов, в среднем, подчиняются соотношению $f_3>f_1>f_2$. Такое соответствие хорошо выполняется для мутаций в окрестности трех изученных мишеней, в то время для трех других наблюдаются примерно одинаковые частоты мутаций в разных позициях кодонов.

Несмотря на успехи современной антиретровирусной терапии, проблема токсичности химиотерапевтических препаратов, а также появление устойчивых форм вируса к ним требуют поиска принципиально новых подходов для этиологического лечения ВИЧ/СПИДа. Одним из таких подходов является использование РНК-интерференции. Для создания такой технологии необходим мониторинг вариабельности ВИЧ-1 в эффективных мишенях РНК-интерференции у больных, в частности в России. В данной работе проведено изучение частот мутаций в районах генома популяции вирусов субтипа А, выделенных из пяти больных. Клонированы и секвенированы 42 области, длиной около 300 п.н., содержащие шесть мишеней РНК-интерференции, из генома клинических вариантов ВИЧ-1 субтипа А. Частоты мутаций оценивали, выравнивая секвенированные последовательности для окрестностей мишеней РНК-интерференции, с помощью алгоритма T-coffee пакета Ugene [1]. Выравнивание проводилось относительно референсной последовательности-фрагменты последовательности изолята ВИЧ-1 субтипа А 97CDKP58e из Республики Конго (GenBank AF316544). Для анализа статистики мутаций и инделей для множественных выравниваний использовали программу CLUSTALW и библиотечные модули к ней Bioperl, Statistics-Descriptive и Math-CDF. Анализ различных частот мутаций в разных позициях кодонов выполняли, используя z-критерий для частот [2]. На рисунке указаны области А1-А6, содержащие мишени РНК-интерференции в геноме ВИЧ-1 субтипа А. Они находятся в жизненно важных генах вируса, кодирующих обратную транскриптазу (RT), интегразу (int), белки vpu, gp120 и p17. Раньше считалось, что RT вносит основной вклад в изменчивость ВИЧ-1 [3]. Тем не менее, появились новые данные, согласно которым APOBEC3 дезаминаза ответственна за 98% выявленных мутаций [4]. Частота же ошибок вирусной RT достигает, по разным оценкам, $5{,}9^{-4}$–$5{,}3^{-5}$ мутаций на пару оснований за цикл копирования [5, 6]. Это ее свойство позволяет вирусу успешно приспособляться к условиям существования и эволюционировать.

РНК-интерференции, которые находятся в изучаемых последовательностях длиной около 300 п.н. Цифры над областями А1–А6 указывают на 5'-позицию мишени РНК-интерференции согласно нумерации в рефересной последовательности (GenBank AF316544).

Средние частоты мутаций в окрестности мишеней (определяли как средние из частот мутаций в данной позиции кодона) сравнивали со средними частотами мутаций непосредственно в мишенях длиной примерно 30 п.н. Для различных мишеней получены следующие значения: А1 — 0,093, 0,086; А2 — 0,098, 0,125; А3 — 0,060, 0,082; А4 — 0,198, 0,214; А6 — 0,111, 0,072 (в каждой паре чисел первое число отвечает средней частоте мутаций в окрестности мишеней, а второе число — средней частоте мутаций непосредственно в мишенях). Различие между частотами мутаций в окрестности мишеней и непосредственно в мишенях следует считать статистически незначимым ($p>0{,}05$).

Частоты вставок и делеций были на два-три порядка ниже по сравнению со средними частотами мутаций [7]. Таким образом, мы наблюдали, что в популяции вирусов, выделенных от пяти больных, частоты мутаций очень сильно зависят от позиции нуклеотида в кодоне. Несомненно, это результат отбора, который происходит как в уже инфицированных клетках, так и при новых случаях инфицирования клеток того же больного. Наши данные убедительно свидетельствуют о том, что RT продуцирует гораздо меньшее число микроинделей, чем число точечных мутаций. Тот факт, что обнаруживается лишь небольшое число инделей, убедительно свидетельствует в пользу нашего предположе-

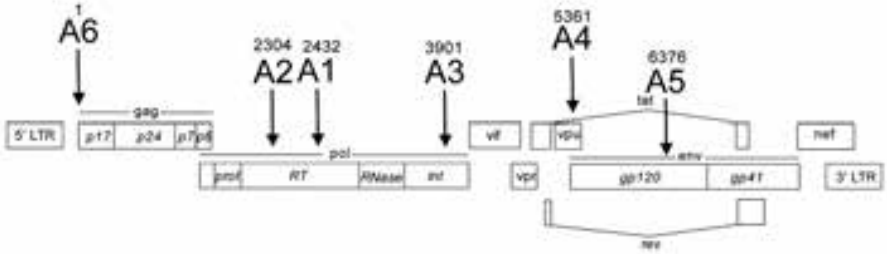


Рисунок. Физическая карта структурных элементов ВИЧ-1. Показано взаимное расположение последовательностей LTR, областей, кодирующих gag- и pol-полипротеины и другие гены вируса. А1–А6-области, содержащие мишени.

ния о важной роли отбора, который обеспечивается, по всей видимости, низкой множественностью инфицирования здоровых клеток, которая связана с механизмами иммунитета больного.

Литература

1. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., Varlamov A.,Vaskin Y., Efremov I., Grehov G., Kandrov D., Rasputin K., Syabro M., Tleukenov T. // Bioinformatics.— 2012.— Vol. 28.— P. 1166–1167.
2. *Джонсон Н., Лион Ф.* Статистика и планирование эксперимента в технике и науке. Методы обработки данных. § 8.7.2. М.: Мир, 1980.
3. *Kim T., Mudry R. A. Jr., Rexrode C. A., Pathak V. K.* Retroviral mutation rates and A-to-G hypermutations during different stages of retroviral replication // J. Virol.— 1996.— Vol. 70.— P. 7594–7602.
4. *Robinson R.* Cellular Defense Enzyme Drives Exceptionally High Rate of Mutation in HIV // PLoS Biol.— 2015.— Vol. 13 (9).— e1002252.
5. *Rezende L. F., Prasad V. R.* Nucleoside-analog resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase and their influence on polymerase fidelity and viral mutation rates // Int. J. Biochem. Cell Biol.— 2004.— Vol. 36.— P. 1716–1734.
6. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication / Abram M. E., Ferris A. L., Shao W., Alvord W. G., Hughes S. H. // J. Virol.— 2010.— Vol. 84.— P. 9864–9878.
7. Оценка частот мутаций в геноме ВИЧ-1 Субтипа А в областях, содержащих эффективные мишени РНК-интерференции / Кравацкий Ю. В., Чечеткин В. Р., Федосеева Д. М., Горбачева М. А., Кретова О. В., Чуриков Н. А. // Молекулярная биология.— 2016.— Т. 50, № 3.— С. 480–485.

АНТИГЕННЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСОВ ГРИППА В, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В РОССИИ В ПЕРИОД С 2014 ПО 2016 гг.

А. И. Желтухина, А. В. Фадеев, А. Б. Комиссаров, Т. Г. Лобова, Д. М.Даниленко, П. А. Петрова, Н. И. Коновалова, А. Д. Васильева, М. Ю. Еропкин

Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

lucky7077@yandex.ru

Грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) являются наиболее массовыми заболеваниями, которые по данным многих специалистов, занимают ведущее место в структуре инфекционных болезней и составляют 80–90% всех случаев инфекционной патологии [1]. Ежегодный экономический ущерб от гриппа в России, в среднем, составляет примерно 86% от экономических потерь, наносимых инфекционными заболеваниями [2].

Выраженная изменчивость вирусов гриппа затрудняет создание эффективных лечебных, профилактических и диагностических средств. Этим обусловлена важность непрерывного этиологического мониторинга, изучения процессов эволюционной изменчивости возбудителей гриппозной инфекции, проводимых на базе Национальных центров по гриппу [3, 4]. Каждый год поступает новая информация об изменении вирусов гриппа, которая позволяет подготовить противогриппозные вакцины на следующий эпидемический сезон, поэтому изучение особенностей циркуляции вирусов гриппа В, их антигенных и молекулярно-биологических свойств является актуальным и имеет не только теоретический интерес, но важно с практической точки зрения.

В результате проделанной работы был определён удельный вес возбудителей гриппа типа В в структуре популяции вирусов гриппа, циркулировавших в эпидемические сезоны 2014–2015 и 2015–2016 гг. Изучены антигенные свойства, проведён генетический и филогенетический анализ представителей 2-х линий вирусов гриппа В — Викторианской и Ямагатской. Выделение проводилось на культурах клеток MDCK и 10-дневных куриных эмбрионах. В качестве исследуемых материалов использовались мазки из носа, взятые у больных с диагнозом «грипп» и «ОРВИ» в которых присутствие РНК вируса гриппа В было подтверждено в полимеразной цепной реакции.

В эпидемический сезон 2014–2015 гг. удельный вес вирусов гриппа В составил 55,0 % от общего числа выделенных возбудителей гриппа и, в основной массе, был представлен вирусами Ямагатской разновидности, в то время как в эпидемическом сезоне 2015–2016 гг. циркулировали в основном штаммы Викторианской линии, и их удельный вес от общего числа вирусов гриппа составил 14,7%.

Изучение антигенных свойств вирусов гриппа В Ямагатской линии эпидемического сезона 2014–2015 гг. в реакции торможения гемагглютинации выявило, что они плохо взаимодействовали с эталонным штаммом B/Massachusetts/2/12, включенным по рекомендации ВОЗ в состав трёхвалентной противогриппозной вакцины на этот сезон. Генетический анализ подтвердил эти различия — вирусы принадлежали к различным кладам Ямагатской ветви этого возбудителя. Вирусы сезона 2014–2015 гг. принадлежали к кладе 3 (эталонный штамм B/Phuket/3073/13) с характерными 12 заменами аминокислотных остатков, 4 из которых находились в антигенных сайтах N116K (BC), S150I (BA), N165Y (BB2), A181T (BD), в то время как B/Massachusetts/2/12 относится к кладе 2 этой антигенной группы.

Проведено изучение антигенных свойств представителей Викторианской линии вирусов гриппа В, циркулировавших в последующем эпидемическом сезоне. Было установлено, что эти вирусы не претерпели существенных изменений в сравнении с эталонными штаммами прежних лет (B/Brisbane/60/08).

Генетический анализ также выявил более медленное изменение структуры этого возбудителя в сравнении

с вирусами Ямагатской разновидности. Исследованные вирусы несли следующий набор аминокислотных замен в молекуле гемагглютинина относительно вакцинного штамма B/Brisbane/60/08: I117V, N129D, V146I. Все перечисленные аминокислотные позиции находятся вне известных антигенных сайтов. Циркулировавшие в эпидемический сезон 2015–2016 гг. вирусы Викторианской линии, принадлежали к кладе 1A (подобны штамму B/Brisbane/60/08).

Зарегистрировано еще большее несоответствие циркулировавших вирусов гриппа B и, поскольку в состав трёхвалентной противогриппозной сезонной вакцины на сезон 2015–2016 гг. был включен представитель Ямагатской ветви (B/Phuket/3073/13).

Таким образом, полученные данные позволяют судить об эволюции вирусов гриппа B, направлении антигенного дрейфа этого возбудителя, что имеет важное значение с практической точки зрения, в том числе для разработки противогриппозных вакцин и диагностических препаратов и ещё раз подтверждают необходимость создания и внедрения квадривалентной противогриппозной вакцины, включающей представителей вирусов гриппа A (H3 и H1) и двух представителей вируса гриппа B — Ямагатской и Викторианской линий.

Литература

1. Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика / Под ред. акад. РАМН проф. О. И. Киселева, д-ра мед. наук Л. М. Цыбаловой, акад. РАМН проф. В. И. Покровского.— М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2012.— 496 с.
2. *Киселев О. И., Ершов Ф. И., Быков А. Т., Покровский В. И.* Пандемия гриппа 2009/2010: противовирусная терапия и тактика лечения.— СПб.: Издательство «НИИ гриппа СЗО РАМН».— 2010.— 97 с.
3. *Соминина А. А., Грудинин М. П., Еропкин М. Ю. и др.* Развитие надзора за гриппом в России в системе национального центра ВОЗ по гриппу // Вопросы вирусологии.— 2012.— Т. 57, № 6.— С. 17–21.
4. *Ambrose C. S., Levin M. J.* The rationale for quadrivalent influenza vaccines// Human Vaccines and Immunotherapeutic.— 2012.— Vol. 8.— P. 81–88.

ВЛИЯНИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА, ЛАКТОФЕРРИНА И ИХ КОМПЛЕКСА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

С. О. Козлов, Н. А. Грудинина, И. В. Кудрявцев, В. А. Костевич, А. В. Соколов

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

stanbiology@gmail.com

Нейтрофилы (НФ) являются ключевым звеном системы врожденного иммунитета организма. Эти клетки играют центральную роль в развитии воспалительного процесса, который развивается в ответ на повреждение собственных структур организма или действие патогенных факторов, а также в разрешении этого процесса. В очаге воспаления НФ способны к осуществлению целого спектра активностей, направленных на элиминацию патогенов или клеточных компонентов. Это обусловлено наличием у НФ гранул различного типа, в том числе азурофильных, несущих в качестве основного компонента фермент миелопероксидазу (МПО), и специфических, содержащих ряд антимикробных белков и пептидов, в том числе лактоферрин (ЛФ).

Под влиянием различных стимулов происходит ступенчатая активация НФ, связанная с появлением на их поверхности большого числа различных рецепторов и запуском процесса респираторного взрыва. НФ обладают способностью к фагоцитозу. Центральную роль здесь играет МПО, которая в присутствии пероксида водорода катализирует образование в фаголизосомах высокореактивных соединений, в первую очередь, гипохлорита. В определенных условиях НФ могут дегранулировать, благодаря чему осуществляется элиминация внеклеточных патогенов. Важно отметить, что преимущественно происходит выброс содержимого специфических, а не азурофильных гранул, что, вероятно, связано с тем, что активность МПО вне клеток может нести серьезную опасность для тканей организма. НФ обладают также способностью к образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs). Это вариант программируемой клеточной гибели, при котором происходит деконденсация хроматина и его выброс из клеток с образованием протяженных сетей, благодаря отрицательному заряду способных пассивно захватывать бактерии, способствуя их иммобилизации. Кроме того, NETs связывают протеолитические ферменты, антимикробные белки и пептиды, включая МПО и ЛФ, участвуя тем самым и в элиминации бактерий.

Особенности регуляции указанных вариантов активности НФ до сих пор изучены недостаточно. В последние годы интерес проявляется к белку острой фазы воспаления церулоплазмину (ЦП). Этот белок обладает целым рядом каталитических свойств, преимущественно антиоксидантных. Известно об ингибирующем влиянии ЦП на активность МПО. В то же время, о непосредственной роли ЦП в процессе воспаления известно меньше. Существует работа, в которой было показано общее противовоспалительное действие ЦП [1]. Кроме того, имеются противоречивые сведения о его влиянии на клетки микроглии и кровяные пластинки. Наконец, известно о влиянии этого белка на адгезию и миграцию НФ в очаг воспаления. Тем не менее, его влияние на эти клетки в очаге воспаления до сих пор не исследовалось.

Известно, что ЦП способен образовывать комплекс с ЛФ. ЛФ обладает антимикробными свойствами. Есть данные о его влиянии на адгезию и миграцию НФ, а также о стимулирующем влиянии на выживание НФ

в очаге воспаления [2]. Тем не менее, роль ЛФ в очаге воспаления также остается не до конца изученной. То же касается и роли комплекса ЛФ-ЦП, возможность присутствия которого в очаге воспаления в условиях *in vitro* и *in vivo* показана экспериментально [3, 4].

В рамках настоящей работы, был впервые проведен полноценный анализ влияния ЦП, ЛФ и их комплекса на основные варианты функциональной активности НФ в условиях in vitro. В работе использовался метод спектрофлуориметрии для оценки уровня активации НФ, и методы иммуноферментного анализа, конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии для оценки влияния белков интереса на фагоцитарную активность НФ, их дегрануляцию и образование NETs, а также на спонтанный апоптоз НФ при длительной инкубации. В работе использовались концентрации белков, приблизительно соответствующие их концентрации в очаге воспаления.

Мы показали ингибирующее влияние ЦП и комплекса ЦП-ЛФ на процесс активации НФ. Комплекс ЦП-ЛФ значительно стимулировал фагоцитарную активность НФ, причем это влияние не сводилось к активностям отдельных компонентов комплекса. Все белки интереса оказывали стимулирующее влияние на дегрануляцию НФ. ЦП стимулировал образование NETs НФ. ЛФ и его комплекс с ЦП стимулировал выживание НФ при длительной (24 часа) инкубации, в то время как ЦП не оказывал влияния на выживание НФ.

На основании полученных результатов и имеющихся литературных данных можно предположить преимущественную роль ЦП, ЛФ и их комплекса в резолюции процесса воспаления, связанную с минимизацией уровня окислительного стресса в очаге воспаления и стимуляцией очистки очага воспаления от остатков погибших клеток, накопившихся белков, ферментов и сигнальных молекул, и пришедших в очаг воспаления клеток.

Литература

1. Protective role of macrophage-derived ceruloplasmin in inflammatory bowel disease / Bakhautdin B., Febbraio M., Goksoy E., De La Motte C. A., Gulen M. F., Childers E. P., … & Fox P. L. // Gut — 2013.— Vol. 62, № 2.— P. 209–219.
2. Lactoferrin inhibits neutrophil apoptosis via blockade of proximal apoptotic signaling events / Francis N., Wong S. H., Hampson P., Wang K., Young S. P., Deigner H. P., Lord J. M. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.— 2011.— Vol. 1813, № 10.— P. 1822–1826.
3. Studies of the ceruloplasmin-lactoferrin complex / Pulina M. O., Zakharova E. T., Sokolov A. V., Shavlovski M. M., Bass M. G., Solovyov K. V., … & Vasilyev V. B. // Biochemistry and cell biology.— 2002.— Vol. 80, № 1.— P. 35–39.
4. Lactoferrin, myeloperoxidase, and ceruloplasmin: complementary gearwheels cranking physiological and pathological processes / Sokolov A. V., Zakahrova E. T., Kostevich V. A., Samygina V. R., Vasilyev V. B. // Biometals.— 2014.— Vol. 27, № 5.— P. 815–828.

ХОЛОДОАДАПТИРОВАННЫЙ ВИРУС В/ЛЕНИНГРАД/14/17/55 — АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ДОНОР АТТЕНУАЦИИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ДЕТЕЙ МЛАДШЕГО ВОЗРАСТА

[1]Е. В. Крутикова, [1]И. В. Киселева, [1]Е. А. Федорова, [1]И. А. Дубровина, [2]Е. А. Большунова, [1]Л. Г. Руденко

[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

[2]Санкт-Петербургский государственный технологический институт, Россия

krutikova.iem@mail.ru

Введение. Вирус гриппа является сильнейшим патогеном, опасным вызываемыми им осложнениями и тяжелым течением заболевания, особенно у маленьких детей. Ключевую роль в предотвращении гриппозной инфекции играет вакцинопрофилактика. Исторически сложилось так, что в качестве доноров аттенуации для отечественной живой гриппозной вакцины (ЖГВ) типа В какое-то время параллельно использовались два холодоадаптированных (ХА) штамма: В/СССР/60/69 (В/60) и В/Ленинград/14/17/55 (В/14). Затем в качестве основного донора выбор пал на В/60, а В/14 остался в качестве резервного.

Несмотря на то, что донор В/60 хорошо зарекомендовал себя и успешно используется для подготовки штаммов ЖГВ уже более 40 лет, не все возрастные группы могут быть проиммунизированы вакциной, подготовленной на его основе. Неохваченной остается группа детей младше 3-х лет, а именно эта возрастная группа является высоко восприимчивой к гриппозной инфекции [1].

Если для ЖГВ типа А в качестве детского донора аттенуации (имеются в виду самые маленькие дети) существует и может быть использован ХА вирус А/Ленинград/134/47/57 [2], то для В компонента ЖГВ альтернативы пока нет. В свете сказанного целью настоящей работы явилось рассмотрение вопроса о возможности усовершенствования резервного донора аттенуации ЖГВ В/14.

Материалы и методы. Культивирование вирусов проводилось в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Оценку температурочувствительности (*ts* фенотип) проводили титрованием вирусов в РКЭ, инкубированных при 32° С и 37° С. Молекулярно-генетический анализ производили методом секвенирования по Сэнглеру. Статистическую обработку данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Доноры аттенуации и вакцинные штаммы ЖГВ, полученные на их основе, характеризуются ts фенотипом и холодоустойчивостью репродукции. В настоящее время доказана прямая связь

между ts фенотипом и аттенуацией (*att*) вакцинных штаммов ЖГВ, однако такой связи между ХА фенотипом и att не обнаружено [3]. Это не удивительно, поскольку холодовая адаптация и связанный с ней ХА фенотип — всего лишь инструмент для получения *att/ts* доноров аттенуации. Поэтому, в нашей работе, как и в аналогичных работах американских исследователей [4], особое внимание уделялось именно *ts* фенотипу.

При сравнении *ts* фенотипа донора аттенуации В/60 и резервного донора В/14 было показано, что последний статистически достоверно более *ts*, чем использующийся в настоящее время в практике здравоохранения В/60. Хотя оба вируса проявляли выраженный *ts* фенотип, разница в инфекционных титрах при репродукции в развивающихся куриных эмбрионах при оптимальной и повышенной температуре составила 4,3±0,2 lg ЭИД50/мл для В/60 и 5,0±0,3 lg — для В/14.

Полученные данные могут говорить о том, что резервный донор В/14 несколько более температурочувствителен, чем В/60, в связи с чем, возможно, и еще более аттенуирован.

Для подтверждения этого предположения геном донора В/14 был отсеквенирован. Мы проанализировали количество значащих мутаций в генах, кодирующих нуклеопротеиновый комплекс трех доноров аттенуации (донора американской вакцины В/Энн Арбор/1/66 и двух отечественных — В/60 и В/14), поскольку известно, что именно этот комплекс отвечает за безопасность и аттенуирующие свойства ХА вирусов гриппа [4, 5]. Было показано, что в генах, ответственных за аттенуацию, у донора В/14 присутствует почти в два раза больше мутаций, чем у доноров В/60 и В/Энн Арбор/1/66 (таблица).

В последнем разделе работы был изучен *att* фенотип доноров В/14 и в/60 в эксприментах *in vivo*. В качестве модели был использован так называемый острый отек легких мышей, когда животных заражают интраназально массивными дозами вируса и оценивают их гибель в течение первых 4–5 дней после заражения. При общем очень низком уровне летальности была отмечена некоторая отсрочка начала гибели животных, зараженных донором В/14, что также свидетельствует в пользу его высокой аттенуации.

Заключение. Таким образом, по показателям температурочувствительности, количеству мутаций в генах, ответственных за аттенуацию, и аттенуирующему фенотипу в системе *in vivo* было установлено, что донор В/14 более аттенуирован, чем донор В/60. Поэтому можно полагать, что ХА вирус В/14 перспективен как донор для подготовки ЖГВ для защиты детей младшего возраста (до 3 лет).

Таблица

Кодирующие мутации во внутренних генах доноров аттенуации типа В

Гены	Количество кодирующих мутаций у доноров		
	В/АА[1]	В/60[2]	В/14[3]
PB2	1	2	4
PB1	1	0	2
PA	2	2	5
NP	4	1	3
M	2	1	1
NS	—	1	1
Всего в NP-комплексе	8	5	14
Всего	10	7	16

[1] — В/Энн Арбор/1/66 [4], [2] — В/СССР/60/69 [5], [3] — В/Ленинград/14/17/55.

Литература

1. Александрова Г. И., Шапошникова Р. П., Смородинцев А. А. Живая гриппозная вакцина для детей (итоги лабораторных и эпидемиологических испытаний в 1961–1970 гг.) // Иммунология и специфическая профилактика гриппа у детей. Л., 1971.— С. 21–45.
2. Attenuated influenza B viruses recombinants, obtained by crossing B/England/12608/76 viruses with a cold-adapted B/Leningrad/l4/17/55 strain / Medvedeva T. E., Gordon M. A., Chendon Yu. Z., Klimov Y. Z., Alexandrova G. I. // Acta Virol.— 1983.— Vol. 27.— P. 311–371.
3. Киселева И. В. Основы аттенуации вируса гриппа: автореф. дис. … д-ра биол. наук: 03.00.06.— СПб., 2001.— 33 с.
4. Multiple gene segment control the temperature sensitivity and attenuation phenotypes of ca B/Ann Arbor/1/66 / Hoffman E., Mahmood K., Chen Z., Yang C.-F., Spaete J., Greenberg H. B., Herlocher M. L., Jin H., Kemble G. // J. Virol.- 2005.- Vol. 79.— P. 11014–11021.
5. Ведущая роль генов полимеразного комплекса в аттенуации доноров отечественной живой гриппозной вакцины А и В / Киселева И. В., Ларионова Н. В., Voeten J. T. M., Teley L. C. P., Drieszen-van der Cruijsen S. K. M. и др. // ЖМЭИ.— 2010.— С.41–47.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ СРЕДИ СОБАК В Г. АЛМАТЫ

Т. Кузнецова, Ж. Ж. Кумекбаева, Т. Алимова, Н. В. Абеленцева, Е. Э. Мейлем

Специализированная ветеринарная диагностическая лаборатория, Алматы, Республика Казахстан

kuznetsova-23@mail.ru

Введение. Чума плотоядных (болезнь Карре) — острая контагиозная болезнь вирусной этиологии, характеризующаяся лихорадкой, воспалением слизистых оболочек, пневмонией, кожной экзантемой и поражением нервной системы [1]. Заболевание распространено повсеместно. Ни при одной другой болезни врачи не ста-

вят столь огромного количества ошибочных диагнозов как при чуме плотоядных ввиду исключительного разнообразия клинических признаков этой болезни.

Цель исследований сводилась к оценке заболеваемости и эффективности наиболее распространенных в повседневной практике методов диагностики чумы плотоядных среди собак в г. Алматы.

Материалы и методы. Исследования были проведены с 2015 г. по апрель 2016 г. в специализированной ветеринарной диагностической лаборатории. Материалом для исследования служили пробы крови, смывы с конъюнктивы глаз и носовой полости от животных с предварительным диагнозом — чума плотоядных.

Отобранные биопробы исследовали на наличие антигена ВЧП в иммунохроматографическом анализе (ИХА) с помощью набора реагентов «Хема тест ВЧП» согласно инструкции по применению. Обнаружение телец-включений проводили путем окраски мазков крови (краситель Diff-Quick) с последующей микроскопией с иммерсией.

В период с 2015 г. по апрель 2016 г. всего было собрано 125 проб крови и смывов с конъюнктивы и носовой полости от животных с предварительным диагнозом чума плотоядных. При исследовании окрашенных мазков крови, положительными считали те образцы, в которых находили гладкие различного диаметра вирусные включения розового или красного цвета.

Результаты и их обсуждение. Результат выявления положительных образцов в микроскопии составил 77 (61,6%), отрицательными оказались 48 проб (38,4%). В ИХА положительными было 80 проб (64%) и 40 (32%) отрицательных от общего количества собранных образцов. Следует также отметить, что при выявлении ВЧП в ИХА пять смывов (4%) оказались сомнительными (рисунок). Вероятно, это можно объяснить недостаточно высокой концентрацией антигена ВЧП в выделениях из глаз и истечениях из носовой полости на момент забора образцов.

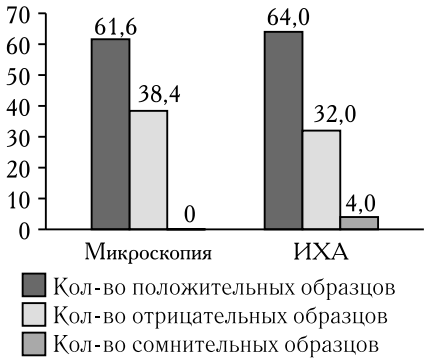


Рисунок. Выявление внутриклеточных включений в образцы крови и антигена ВЧП в смывах с конъюктивы и носовой полости от животных.

Кроме сравнения эффективности методов диагностики чумы плотоядных была определена интенсивность встречаемости заболевания помесячно. Так наибольшее количество подозреваемых животных было зарегистрировано с конца февраля и до апреля в 2015 г., тогда как в 2016 г.— с конца января и до середины марта. Необходимо также отметить, что в 2016 г. с середины марта были отмечены случаи аденовирусной инфекции, клинические признаки которой во многом схожи с симптомами чумы плотоядных.

Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод, что для клинической практики, наряду с ИХА, выявление на ранней стадии патогномоничных для чумы плотоядных телец-включений является вспомогательным методом лабораторной экспресс-диагностики данного заболевания, не требующим больших экономических затрат.

Литература

1. Болезни собак / Белов А. Д., Данилов Е. П., Дукур И. И., Копёнкин Е. П., Майоров А. И., Митин В. Н., Мустакимов Р. Г., Плахотин М. В., Пономарьков В. И., Филиппов Ю. И., Чижов В. А.— М.: «Колос», 1995.— С. 259–270.

ВЛИЯНИЕ СУПЕРНАТАНТОВ РАЗРУШЕННЫХ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* НА МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

[1]Д. Т. Маммедова, [2]Э. А. Старикова, [2]И. С. Фрейдлин
[1]Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет), Россия
[2]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

jennet_m@mail.ru

Введение. В последнее время в литературе накапливается всё больше данных о цитопатическом влиянии бактериальной аргининдеиминазы на эндотелиальные клетки человека [1–5]. Механизмы, лежащие в основе данного процесса, изучены недостаточно хорошо. Известно, что перестройки цитоскелета регулируют множество клеточных процессов, в том числе пролиферацию, миграцию, межклеточные взаимодействия [6]. Исходя из данных о том, что дефицит аргинина может приводить к нарушению структуры цитоскелета [5, 6], было вынесено предположение, что цитопатическое действие аргининдеиминазы *S. pyogenes* в отношении эндотелиальных клеток связано с нарушением структуры цитоскелета.

Целью исследования было изучение влияния аргининдеиминазы *S. pyogenes* на миграционную активность и структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток линии EA.hy926.

Материалы и методы исследования. В работе использовали супернатанты разрушенных *S. pyogenes* M49–16wt и его изогенного мутанта с делецией гена аргининдеиминазы (M49–16delAD), а также супернатанты разрушенных *S. pyogenes* M22 (любезно предоставленные д.м.н., проф. Суворовым А. Н. и д.м.н. Буровой Л. А., отдел молекулярной микробиологии, ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург) и выделенную из стрептококков этого штамма аргининдеиминазу (любезно предоставленную д.б.н. Соколовым А. В., отдел молекулярной генетики, ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург). Влияние бактериальных факторов на миграционную активность эндотелиальных клеток изучали в модели «раны» *in vitro*. Результаты были обработаны в программе Статистика 5.0 с использованием t-критерия Стьюдента. Для анализа влияния бактериальных факторов на структуру актинового цитоскелета проводили окрашивание клеток фаллоидин-родамином (Invitrogen). Препараты анализировали с помощью микроскопа Axio Observer. D1 (Zeiss) и программы AxioVision Rel. 4.7 (Zeiss).

Результаты и их обсуждение. Было показано, что супернатанты разрушенных *S. pyogenes*, также как аргининдеиминаза, достоверно снижали миграционную активность эндотелиальных клеток (таблица) и изменяли структуру их актинового цитоскелета. Супернатант разрушенных *S. pyogenes* M49–16delAD с делецией гена аргининдеиминазы обладал достоверно сниженной способностью подавлять миграцию клеток по сравнению с супернатантом разрушенных *S. pyogenes* M49–16wt (таблица). При этом не было выявлено существенных различий в структуре актиновых филаментов у клеток, культивируемых в присутствии супернатантов разрушенных *S. pyogenes* M19–16wt, и клеток, культивируемых в присутствии его изогенного мутанта. Добавление в культуру клеток, содержащую супернатанты разрушенных *S. pyogenes*, экзогенного аргинина не приводило к восстановлению их миграционной активности (таблица) и структуры актинового цитоскелета. Однако при компенсации дефицита аргинина, вызванного активностью аргининдеиминазы, миграционная активность клеток достоверно усиливалась, а структура актинового цитоскелета эндотелиальных клеток восстанавливалась (таблица).

Таблица

Влияние факторов супернатантов разрушенных стрептококков и аргинина на миграционную активность эндотелиальных клеток линии EA.hy926

Культивирование в присутствии	Площадь, свободная от клеток (M±SD) % при культивировании		
	без аргинина (n=18)	в присутствии 2 мМ аргинина (n=12)	в присутствии 4 мМ аргинина (n=18)
Контроль (культуральная среда)	100	120±13	113±12
S. pyogenes тип M22	193±12*	226±21*×	225±13*°
S. pyogenes тип M49- 16wt	175±12*	182±16*×	190±16*°
S. pyogenes тип M49- 16delAD	150±10*■	153±12*×■	153±10*°■
Аргининдеиминазы, 3 мкг/мл	163±8*	147±6*×▲	113±3*°▲

Примечание: * — отличия от контроля достоверны при $\rho < 0{,}001$, × — отличия от контроля в присутсвии 2 мМ аргинина достоверны при $\rho < 0{,}001$, ° — отличия от контроля в присутсвии 4 мМ аргинина достоверны при $\rho < 0{,}001$, ▲ — миграция клеток в присутствии аргининдеиминазы достоверно отличается от миграции клеток в присутствии аргининдеиминазы и аргинина, при $\rho < 0{,}05$, ■ — миграция клеток в присутствии *S. pyogenes* тип M49-16wt достоверно отличается от миграции клеток в присутствии *S. pyogenes* тип M49-16delAD при $\rho<0{,}01$.

Заключение. Исследования показали, что снижение миграционной активности эндотелиальных клеток частично обусловлено нарушением структуры актинового цитоскелета. Изученные процессы связаны со способностью аргининдеиминазы вызывать дефицит аргинина в культуральной среде.

Литература

1. *Старикова Э. А., Лебедева А. М., Бурова Л. А., Фрейдлин И. С.* Изменение функциональной активности эндотелиальных клеток под влиянием лизата S. Pyogenes // Цитология.— 2012.— Т. 54, № 1.— С. 1–15.
2. *Starikova E. A., Sokolov A. V., Vlasenko A. Y.* Biochemical anbiological activity of arginine deiminase from Streptococcus pyogenes M22 // Biochem. Cell Biol.— 2016.— Vol. 94.— P. 1–9.
3. *Park I. S., Kang S. W., Shin Y. J.* Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth // Br. J. Cancer.— 2003.— Vol. 89.— P. 907–914.
4. Recombinant arginine deiminase as a potential antiangiogenic agent / Beloussow K., Wang L., Wu J., Ann D., Shen W. C. // Cancer. Lett.— 2002.— Vol. 183, № 2,— P. 155–162.
5. *Wei Zh., Xiaomin S., Zhou H., Luo Y.* Arginine deiminase modulates endothelial tip cells via excessive synthesis of reactive oxygen species // Biochemical Society Transactions.— 2011.— Vol. 39 (5).— P. 143–147.
6. *Pavlyk I., Rzhepetskyy Y., Jagielski A. K.* Arginine deprivation affects glioblastoma cell adhesion, invasiveness and actin cytoskeleton organization by impairment of β actin arginylation // Amino Acids.— 2015.— Vol. 47.— P. 199–212.

АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

А. С. Мамонтов, П. Г. Назаров, Ю. А. Дешева, Л. Г. Руденко
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

an.mamontow@yandex.ru

Введение. Тучные клетки (ТК) относятся к системе врожденного иммунитета и экспрессируют характерные для этой системы рецепторы — для микробных и вирусных веществ (TLR), факторов комплемента (CR3, CR5) и Fc-рецепторы для IgE и IgG [1]. Общеизвестна роль ТК и их Fce-рецепторов для IgE в механизме реакций гиперчувствительности немедленного типа. Предполагается участие ТК также в реакциях иммунокомплексного типа (феномен Артюса и др.), однако роль ТК и их Fc-рецепторов для IgG (FcgR) в этих процессах изучены значительно хуже [2]. Иммунокомплексная патология широко распространена, в связи с чем изучение роли в ней ТК весьма актуально.

Цель работы — изучить реакцию ТК перитонеального экссудата мышей *in vitro* на IgG-содержащий иммунный комплекс.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на интактных мышах линии CBA, полученных из питомника «Рапполово». Источником ТК служил перитонеальный экссудат, полученный промыванием полости забуференным физиологическим раствором (ЗФР). Клетки отмывали и вносили по 1 млн в микропробирки, добавляли по 25 мкл иммунной сыворотки мышей CBA, содержащей IgG-антитела к вирусу гриппа A(H7), инкубировали 1 ч при 4° С для связывания IgG с Fc-рецепторами клеток, после чего трижды отмывали ЗФР. Осадки ресуспендировали в ЗФР, добавляли антиген (апатогенный вирус гриппа человека A(H7N3) или A(H7N9)) и инкубировали 1 ч при 4° С для образования иммунного комплекса с IgG-антителами на поверхности ТК. Клетки снова отмывали и помещали на 37° С на 30 мин для реакции дегрануляции ТК. Контролями служили инкубации: 1) только с IgG-антителами, 2) только с вирусом, 3) только с ЗФР (негативный контроль), 4) с очищенными крысиными антителами к IgE мыши (BD Pharmingen, clone R35–72; позитивный контроль). Степень дегрануляции оценивали по выходу гистамина микрометодом P.Shore [2]. Статистические сравнения проводили с использованием параметрического критерия Стьюдента.

Результаты исследования. Результаты представлены на рисунке. Иммунная сыворотка мышей, содержащая IgG-антитела к вирусу гриппа, а также суспензия вируса были испытаны в предварительных опытах для выбора разведений, которые не оказывали бы на ТК существенного эффекта. В качестве рабочих были отобраны разведения, указанные в подписи к рисунку. Иммунный комплекс, сформированный на поверхности клеток путем последовательных инкубаций сначала с IgG-антителами, а затем со специфичным для этих антител антигеном (вирусами гриппа, содержащими гемагглютинин H7, к которому были получены антитела), с отмывкой клеток после каждой инкубации,— вызывает достоверное повышение выброса гистамина по сравнению с эффектами только иммунсыворотки или только вирусов. Дегрануляцию ТК, отличную от контрольных цифр, вызывало лишь сочетание антител и антигена. Таким образом, можно утверждать, что клетки реагировали именно на иммунный комплекс.

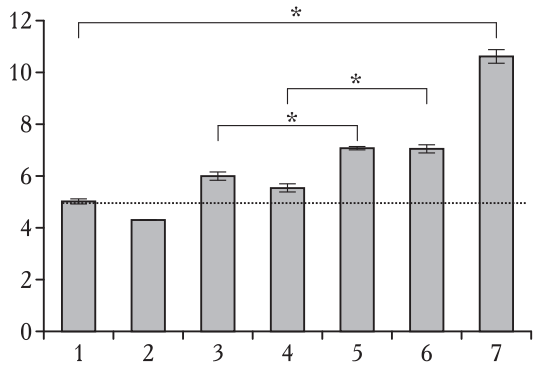


Рисунок. По оси абсцисс: 1) ТК+ЗФР, 2) ТК+АТ (1/1000), 3) ТК+H7N3 (1/1000), 4) ТК+H7N9 (1/1000), 5) ТК+АТ (1/1000)+H7N3 (1/1000), 6) ТК+АТ (1/1000)+H7N9 (1/1000), 7) ТК+анти-IgE (1/800). По оси ординат — оптическая плотность, отражающая содержание в супернатанте клеток люминесцирующего продукта конденсации гистамина с ортофталевым альдегидом. ТК — тучные клетки, АТ — антитела (иммунная сыворотка мышей CBA к вирусу гриппа человека A(H7) в указанном ниже разведении, анти-IgE — крысиные очищенные антитела к IgE мыши, ЗФР — забуференный фосфатами физиологический раствор NaCl. Пунктир — уровень контроля. Каждый столбик — средняя арифметическая по трем измерениям. * — столбики, соединенные лигатурой, достоверно отличаются друг от друга ($p<0,05$). Представлены результаты одного из трех репрезентативных опытов.

Обсуждение результатов. Эксперименты производились не с очищенной популяцией ТК, а с пулом перитонеальных клеток, в котором доля ТК составляет около 10% среди клеток других типов — лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов. Необходимы дальнейшие эксперименты с очищенной фракцией ТК. В то же время, ТК являются основными продуцентами и активными выделителями (с мгновенным выбросом) гистамина. Это позволяет считать, что ответ на иммунный комплекс в виде либерации гистамина в наших опытах был реакцией со стороны преимущественно ТК.

Полученные данные показывают, что ТК способны к антигенспецифичным реакциям. Но по сравнению с Т- и В-лимфоцитами, их следует считать игроками второго плана, так как они не обладают настоящими антигенраспознающими рецепторами. Их антигенспецифичный ответ возможен только при наличии в окружающей среде готовых антител, то есть в рамках вторичного иммунного

ответа гуморального типа. Именно сорбция произведенных В-клетками антител на Fc-рецепторах ТК позволяет последним реагировать на антиген выбросом медиаторов — как преформированных и выбрасываемых немедленно (гистамин, серотонин, TNFa и др.), так и синтезируемых *de novo*, секреция которых запускается актом антигенспецифичного распознавания. ТК не являются клетками-эффекторами, не участвуют непосредственно в элиминации антигена путем, например, фагоцитоза или киллинга. Их роль сигнальная, своими медиаторами они привлекают для элиминации антигена другие клетки иммунной системы. ТК являются долговременными носителями антител класса IgE [3, 4], которые хранятся долгое время в связанном с мембранными Fce-рецепторами виде и в любой момент готовы к взаимодействию с соответствующим аллергеном. Способны ли ТК к продолжительному носительству связанных антител класса IgG в настоящее время не известно.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 15-04-08009.

Литература

1. *Кутукова Н. А., Назаров П. Г.* Тучные клетки: роль в роль в воспалении, восстановлении тканей и развитии фиброза // Цитокины и воспаление.— 2014.— Т. 13 (2).— С. 11–20.
2. *Nazarov P. G., Pronina A. P.* The influence of cholinergic agents on histamine release from HMC-1 human mast cell line stimulated with IgG, C-reactive protein and compound 48/80 // Life Sci.— 2012.— Vol. 91 (21–22).— P. 1053–1057.
3. Выброс гистамина из тучных клеток в ответ на стимуляцию лигандами Fc - и Fc -рецепторов сдерживается ацетилхолином через холинорецепторы никотинового типа / Иванова Н. А., Власова О. Н., Назаров П. Г., Климович В. Б., Самойлович М. П. // Цитокины и воспаление.— 2014.— Т. 12 (1).— С. 98.
4. *Hazenbos W. L., Gessner J. E., Hofhuis F. M. et al.* Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice // Immunity.— 1996.— Vol. 5 (2).— P. 181–188.
5. *Greer A. M., Wu N., Putnam A. L. et al.* Serum IgE clearance is facilitated by human Fc RI internalization // J. Clin. Invest.— 2014.— Vol. 124 (3).— P. 1187–1198.

МНОГОМЕРНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНИТЕТА С ВЫДЕЛЕНИЕМ РОЛИ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЛУЧЕВЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ЛЕГКИХ

Т. Ю. Мушкарина, Е. Г. Кузьмина

Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба — филиал Федерального медицинского исследовательского центра им. П. А. Герцена Министерства здравоохранения РФ, Обнинск, Россия

jeweltany@gmail.com

Введение. Повреждения, вызываемые лучевой компонентой комбинированного лечения опухолевых заболеваний, представляют нерешенную проблему в медицине. Несмотря на излечение основного заболевания, качество жизни пациентов при их развитии существенно хуже. Многофакторный патогенез лучевых повреждений (величина подведенной дозы, фракций, индивидуальная радиочувствительность, технические недостатки аппаратуры и др.) изучен слабо. Необходимо определять молекулярно-клеточные изменения, происходящие в организме при развитии лучевых осложнений, в частности, связанные с нарушениями иммунитета. Особая роль в поддержании стабильности иммунных реакций принадлежит Т-регуляторным клеткам. Более 20 лет интерес к этой минорной популяции в научном мире не утихает [1]. С повышением их количества связывают развитие опухолевых и инфекционных заболеваний, со снижением — аллергических и аутоиммунных заболеваний [2, 3].

Целью данной работы является проведение многомерного анализа иммунитета при лучевых повреждениях легких и оценка вклада Т-регуляторных клеток в проявлении отклонений. Для достижения цели сформулированы и решены следующие задачи:

1. Распределены иммунокомпетентные клетки по степени и типу их участия в функционировании иммунной системы при лучевых повреждениях легких, используя многофакторный анализ.

2. Оценено влияние Т-регуляторных лимфоцитов на клетки иммунитета и их функциональную активность, используя корреляционный анализ.

Материалы и методы исследования. Обследованы 45 пациентов до лечения лучевого пневмофиброза, развившегося после комбинированного лечения рака молочной железы, легкого и лимфомы Ходжкина. Использованы 52 теста: относительное и абсолютное количество Т-, В-, НК-лимфоцитов; хелперная и цитотоксическая субпопуляции Т-клеток; активированные лимфоциты и Т-клетки; Т-регуляторные клетки; соотношение наивных и клеток памяти среди лимфоцитов и хелперной субпопуляции, апоптоз лимфоцитов и Т-хелперов (CD3+, CD19+, CD16+56+, CD4+, CD8+, HLA-DR+, CD3+HLA-DR+, CD45+CD4+CD25+CD127-, CD45RA+CD45RO-, CD45RA-CD45RO+, CD4+CD45RA+CD45RO-, CD4+CD45RA-CD45RO+, CD3+CD95+, CD4+CD95+), пролиферация лимфоцитов, индуцированная ФГА (реакция бласттрансформации лимфоцитов — РБТЛ), иммуноглобулины M,G,A классов сыворотки крови и фагоцитоз. Статистический многофакторный и корреляционный анализы выполнены в программе «STATISTICA 8.0».

Результаты и их обсуждение. Рассмотрены первые 7 главных компонент, выделенные факторным анализом из массива данных, отражающие наиболее существенные взаимодействия между клетками. Первую по значению компоненту (12% общей дисперсии) образовали абсолютные значения лимфоцитов; Т-клетки и их функциональное состояние: наивные и клетки памяти, Т-регуляторные лимфоциты, клетки, находящиеся в апоптозе. Вторая компонента (6,4%) выявила значимость соотношения Т-хелперных и Т-цитотоксических лимфоцитов и Т-хелперы в апоптозе. Третья и четвертая компоненты (совместный вклад — 10,9%) определяют роль процессов активации Т-клеток. Следующие три фактора, каждый с весом по 4%, последовательно характеризуют клеточную гибель лимфоцитов и фагоцитоз; уровень В-клеток и РБТЛ; роль НК-клеток и их взаимосвязи с активацией и гибелью Т-клеток и фагоцитозом. Корреляционным анализом Спирмена обнаружена разнонаправленность связей, проявляемых относительным и абсолютным числом Т-регуляторной популяции. Повышение процента Т-регуляторных клеток угнетает реакции Т-клеточного иммунитета, в том числе Т-хелперы, пролиферацию в РБТЛ, снижает соотношение наивных лимфоцитов и клеток памяти, Т-клетки, меченные доменом смерти. Снижается уровень В-клеток и концентрация иммуноглобулинов М и G классов. Прямые корреляции связывают процент Т-регуляторов с процентом цитотоксических Т-лимфоцитов и поздней активацией лимфоцитов и Т-клеток (HLA-DR+CD3+, HLA-DR+). Динамика абсолютного количества регуляторных Т-клеток прямо коррелирует с числом общих Т-клеток, Т-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов, их гибелью по пути апоптоза, с числом лимфоцитов памяти, в том числе Т-хелперных клеток памяти. Обратная зависимость связывает возрастание их числа со снижением количества активированных и наивных клеток лимфоцитарного пула и процента НК-клеток.

Заключение. Фиброз легких развивается на фоне повышения процента Т- регуляторных лимфоцитов, коррелирующих со значительным дефицитом лимфоцитов крови, преимущественно за счет угнетения Т-клеточного звена. Нарушается важный механизм, регулирующий соотношение клеточного и гуморального типов реакций иммунной системы: повышена гибель Т-хелперов при сохранении числа Т-цитотоксических лимфоцитов, что снижает их нормальный баланс. Также изменено нормальное соотношение наивных и клеток памяти Т-хелперных лимфоцитов: значительно выше уровень Т-клеток памяти и ниже число наивных Т-клеток. Повышенная гибель и снижение популяции Т-клеток не компенсируются ростом пула В- и НК-лимфоцитов, отмечается лишь их относительное повышение. Реализация угнетающего действия регуляторных Т-клеток, по-видимому, происходит поэтапно: возрастание их количества до определенного уровня не вызывает супрессии, она проявляется лишь при достижении определенного процента Т-регуляторов.

Литература

1. Verbist K. C., Wang R., Green D. R. T cell metabolism and the immune response// Seminars in Immunology.— 2012.— Vol. 24.— P. 399–404.
2. Кравченко П. Н., Олейник Е. К. Система регуляторных Т-клеток и аутоиммунные процессы// Труды Карельского научного центра РАН.— 2013.— № 3.— С. 18–30.
3. Сорочан П. П., Громакова И. А., Прохач Н. Э. Регуляторные Т-клетки и новые стратегии противоопухолевой иммунотерапии // Международный медицинский журнал.— 2009.— № 2.— С. 85–90.

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ГЛИКОКОНЪЮГАТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДНОГО АНТИГЕНА *S. PNEUMONIAE* И СТОЛБНЯЧНОГО АНАТОКСИНА

Р. И. Нуриев, И. А. Гальвидис, Н. Е. Ястребова, М. А. Буркин
Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия
Rinat1nuriev@gmail.com

Введение. Конъюгированные вакцины незаменимы в борьбе с заболеваниями, вызываемыми инкапсулированными бактериями, поскольку обеспечивают формирование стойкого и долговременного иммунного ответа к полисахаридным антигенам при применении даже у детей младше 2 лет. Такие препараты содержат в своем составе два ковалентно связанных между собой компонента — полисахаридный, служащий основным антигеном, и белковый, выполняющий роль носителя [1]. В данной работе предлагается иммунохимический принцип оценки экспериментальных гликоконъюгатных препаратов против *S. pneumoniae*, синтезированных с использованием в качестве носителя столбнячного анатоксина (САТ). Потенциально такие препараты, при условии сохранности конформации протективных эпитопов, должны обеспечивать формирование защитных антител сразу к двум антигенам — капсульному полисахариду пневмококка и САТ. При создании таких вакцин удалось бы не только обеспечить иммунную защиту сразу против нескольких патогенов — *S. pneumoniae* и *C. tetani*, тем самым сократив количество отдельных вакцинаций, но и решить проблему интерференции — мало прогнозируемой иммунологической реакции, вызванной предшествующей и последующей вакцинациями САТ. Для этого важен контроль

сохранности протективных антигенных структур в процессе конъюгации, в связи с чем возникает необходимость в разработке специальных систем анализа.

Материалы и методы исследования. Синтез гликоконъюгатов проводился восстановительным аминированием капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 9N и карбодиимидной активацией САТ в нескольких режимах, различающихся по соотношению между полисахаридным и белковым компонентами [2].

Для разработки методов контроля на основе ИФА использовали противостолбнячную сыворотку (ПСС) и САТ (НПО «Биомед», Пермь), капсульные полисахариды из среды культивирования *S. pneumoniae* серотипа 9N, антиполисахаридную (анти-Ps9N) сыворотку, протективные моноклональные антитела (МК-АТ) к САТ, полученные раннее и проявляющие нейтрализующую активность в тестах *in vivo*, а также пероксидазные конъюгаты антител к Ig кролика и лошади [3, 4].

Анализ полученных гликоконъюгатов осуществляли в электрофорезе в 7% полиакриламидном геле (SDS-PAGE) с последующим окрашиванием Кумасси. Иммуноблоттинг конъюгатов проводили с использованием ПСС и анти-Ps9N.

Результаты и их обсуждение. Получены гликоконъюгаты с разным соотношением САТ и Ps9N в диапазоне 3:1–0,3:1. Эффективность процесса конъюгации и сохранность протективных эпитопов контролировали разработанными вариантами сэндвич-ИФА, имеющими, в зависимости от типа иммобилизованных МК-АТ, предел определения САТ от 1 до 20 нг/мл. Взаимодействие САТ с МК-АТ, обладающими нейтрализующей токсин активностью, свидетельствовало о сохранности протективных структур антигена. При использовании ПСС в качестве вторых антител определялся свободный (неконъюгированный) анатоксин, позволяя косвенно судить об эффективности процесса конъюгации. Регистрация комплексов в другом варианте ИФА, с использованием в качестве вторых антител анти-Ps9N подтверждала факт формирования молекул гликоконъюгата САТ-Ps9N и одновременно позволяла судить о сохранности и стерической доступности протективных эпитопов САТ в его составе. Полученные результаты затем были подтверждены в SDS-PAGE и иммуноблоттинге.

Заключение. В ходе данной работы были синтезированы гликоконъюгаты на основе полисахаридного антигена *S. pneumoniae* и столбнячного анатоксина. Для их первичной иммунохимической проверки разработаны специальные варианты ИФА. Согласно результатам этих тестов, в полученных гликоконъюгатных препаратах протективные эпитопы антигенов сохранили свою исходную конформацию в результате конъюгирования, и, значит, теоретически они способны обеспечивать формирование защитного иммунного ответа к обоим антигенным компонентам. Планируется проведение исследований полученных препаратов на лабораторных животных.

Литература

1. *Findlow H., Borrow R.* Interactions of conjugate vaccines and co-administered vaccines // Hum Vaccin Immunother.— 2016.— Vol. 12, № 1.— P. 226–30.
2. Bioconjugate techniques / Hermanson G. T. (Ed.). 3rd Edition — London: Academic Press, 2008.— 1200 p.
3. *Burkin M. A., Sviridov V. V., Perelygina O. V.* Determination of tetanus toxin and toxoid by ELISA using monoclonal antibodies // Applied Biochemistry and Microbiology.— 2004.— Vol. 40, № 4.— С. 409–414.
4. *Burkin M. A., Galvidis I. A., Yakovleva I. V., Sviridov V. V.* Use of monoclonal antibodies against horse immunoglobulin in an enzyme immunoassay of bacterial toxins and toxoids // Applied Biochemistry and Microbiology.— 2007.— Vol. 43, № 1.— С. 98–101.

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕННОЙ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ИЗОЛЯТОВ РСВ, ВЫДЕЛЕННЫХ В г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

Е. Р. Петрова, А. В. Фадеев, И. В. Поляков, А. А. Егорова

Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

ekaterina.petrova@influenza.spb.ru

Введение. Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является одной из оновных причин госпитализации детей, особенно первых двух лет жизни. В настоящее время в мировой вирусологии большое внимание уделяется исследованиям изменчивости РСВ, что обусловлено пониманием практической важности изучения механизмов эволюции данного патогена. Исследования в области молекулярной эпидемиологии свидетельствуют о генетической и антигенной вариабельности вируса. Циркулирующие вирусы в зависимости от особенностей взаимодействия с вирусспецифичными моноклональными антителами (МКА) отнесены к двум антигенным группам (А и В), которые подразделяются на множество генетических вариантов. В литературе имеются данные о связи клинических проявлений РСВ-инфекции (РСВИ) с группой и/или генотипом вызывающего ее вируса [1, 2].

Целью настоящего исследования являлась характеристика антигенной и генетической изменчивости изолятов РСВ, выделенных в г. Санкт-Петербурге.

Материалы и методы исследования. Для выделения РСВ в культуре клеток МА-104 использовали ПЦР-положительные клинические материалы (назаль-

ные мазки). Для определения групповой (А/В) принадлежности изолятов РСВ с использованием ОТ-ПЦР в реальном времени были выбраны следующие праймры и зонды:

а) для выявления РСВ-А: AGATCAACTTCTGTCATCCAGCAA (прямой), TTCTGCACATCATAATTAGGAGTATCAAT (обратный), CACCATCCAACGGAGCACAGGAGAT (зонд);

б) для выявления РСВ-В: GGCTGAATCATTTCCTCACATCATG (прямой), CTTCTACCATTCAAGCAATGACCTCTAAT (обратный), TTACATAAAAACCTCAAGTATCACAATCAAACACTAAATCGACA (зонд).

При секвенировании гена F-белка РСВ-А использовались следующие праймеры: TGTAAAACGACGGCCAGTGGGGCAAATAACAATGGAGTT(прямой), CAGGAAACAGCTATGCATTGTAAGAACATGATTAGGTGCT (обратный).

Антигенный анализ изолятов РСВ проводили методом микрокультурального ИФА (мк-ИФА) с использованием панели из 6 МКА (9С5, RS-25, 4F2, 5F3, 5Н8, 1Н3), разработанных в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа. Для этого монослойные культуры клеток МА-104, выращенные на 96-луночных культуральных планшетах, инфицировали РСВ в дозе 100ТИД$_{50}$. Через 5–10 дней культивирования после развития признаков цитопатогенного действия вируса клетки фиксировали 80% ацетоном. В лунки вносили МКА в концентрации 5–10 мкг/мл. Детекцию связавшихся с вирусом МКА проводили добавлением пероксидазного конъюгата козьих антител к IgG мыши. После остановки реакции 2Н H_2SO_4 и добавления субстратной смеси (0,02% H_2O_2 и 0,1 мг/мл 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин) результат учитывали на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Результаты и их обсуждение. По результатам ОТ-ПЦР было показано, что из 73-х изолятов РСВ, выделенных в культуре клеток в 2013–2014 гг., основная масса вирусов (93,2%) относилась к группе А, и только 5 (6,8%) относились к группе В. В 2015–2016 гг. было выделено 30 штаммов: 21 (70%) из группы А, 9 (30%) — из группы В.

Для характеристики антигенных свойств изолятов РСВ использовали панель МКА, специфически взаимодействующих (по данным иммуноблоттинга) с вирусным поверхностным гликопротеином F, определенные детерминанты которого индуцируют синтез вирус-нейтрализующих антител при РСВИ. Сайты взаимодействия разных МКА с F-белком не перекрываются, что было показано методом конкурентного ИФА с МКА, меченными и немеченными пероксидазой. МКА 5F3 и 5Н8 обладали вирус-нейтрализующей активностью. Все МКА взаимодействовали с референсным РСВ-А (штамм Long) с равной эффективностью.

С помощью МКА в мк-ИФА был проведен антигенный анализ 64 штаммов РСВ-А, выделенных в 2013–2014 гг. Показатель эффективности взаимодействия каждого изолята с МКА RS-25 был принят за 100%. Снижение связывающей активности других МКА по сравнению с данным показателем свидетельствовало об изменении антигенных свойств F-белка вирусных изолятов. Оценка эффективности взаимодействия с различными МКА позволила разделить штаммы на ряд антигенных подгрупп, отличных от эталонного штамма Long.

У 12 штаммов, принадлежащих к трем антигенным подгруппам, было проведено секвенирование гена F-белка. Сравнение результатов секвенирования и мк-ИФА показало, что снижение эффективности взаимодействия конкретного штамма с различными МКА коррелировало с наличием характерных единичных штамм-специфичных аминокислотных замен в F-белке (в сравнении с референс-штаммом Long). Так, замены С367G/W (в сайте, примыкающем к антигенному сайту I, и возможно входящем в него) коррелировали со значительным снижением эффективности взаимодействия с МКА 5Н8.

Замены N276S/H (позиция, входящая в состав антигенного сайта II), могут приводить к снижению взаимодействия вирусов данной подгруппы с тремя МКА: 5F3, 1Н3 и 5Н8.

Значительное снижение взаимодействия изолятов с МКА 9С5, 1Н3 и 5Н8 может быть связано с наличием замен N276S/H (позиция в антигенном сайте II) и Т118А/Т122А, что ведет к утрате сайтов потенциального N-гликозилирования.

Заключение. Таким образом, анализ F-белка, одного из основных поверхностных гликопротеинов РСВ, выявил значительные различия в генетической структуре и антигенных свойствах данного белка у вирусов, циркулировавших в Санкт-Петербурге в сезон 2013–2014 гг.

Литература

1. Characteristics and Their Clinical Relevance of Respiratory Syncytial Virus Types and Genotypes Circulating in Northern Italy in Five Consecutive Winter Seasons / Esposito S., Piralla A., Zampiero A., Bianchini S., Di Pietro G., Scala A., Pinzani R., Fossali E., Baldanti F., Principi N.// PLoS ONE.— 2015.— Vol. 10 (6) — P. 1–14.
2. *Martinello R., Chen M., Weibel C., Kahn J.* Correlation between Respiratory Syncytial Virus Genotype and Severity of Illness // The Journal of Infectious Diseases — 2002.— Vol. 186.— P. 839–842.

ОСОБЕННОСТИ АНТИГЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВИРУСОВ ГРИППА А И В, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2015–2016 гг.

П. А. Петрова, Н. И. Коновалова, С. М. Щеканова, А. Д. Васильева, Т. Г. Лобова, А. И. Желтухина, М. Ю. Еропкин

Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

suddenkovapolina@gmail.com

В эпидемический сезон 2015–2016 гг. удалось выделить 180 штаммов вирусов гриппа из назофарингиальных мазков от госпитализированных детей. Выделение происходило на клеточной линии MDCK и развивающихся куриных эмбрионах [1]. Выявлено, что удельный вес вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 составил 80,5%, вирусов гриппа B Викторианской разновидности — 18,3%, вирусов гриппа B Ямагатской разновидности — 0,55% от всех выделенных штаммов. Вирусов гриппа типа A(H3N2) в текущем сезоне не выделено. Было отмечено, что наиболее эффективно выделение вирусов гриппа A и B происходило на клеточной культуре MDCK. По результатам ПЦР-диагностики и вирусовыделения установлено, что наиболее подвержены заболеванию гриппом дети возрастных групп 0–1, 2–3 и 3–6 лет, а наименее подвержены заболеванию гриппом дети возрастных групп 8–12 и 12–15 лет.

Проведен анализ антигенных свойств гемагглютинина циркулирующих штаммов в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) для оценки их соответствия с современными эталонными и вакцинными штаммами. Для более наглядного представления результатов РТГА был использован метод антигенной картографии, который основан на использовании многомерных математических моделей, которые позволяют получить двумерное или трехмерное изображение — антигенную карту. Построение карт проводили с использованием бесплатного программного обеспечения в режиме онлайн, расположенного на сайте http://antigenic-cartography.org [2].

Установлено, что все современные штаммы вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, выделенные в Санкт-Петербурге, антигенно подобны эталонному вирусу A/Калифорния/7/09, а также современному вакцинному штамму A/Боливия/559/13. В РТГА современные изоляты реагировали с сыворотками к данным вирусам до ½–¼ гомологичного титра, что доказывает их антигенное родство. За семилетний период циркуляции в человеческой популяции вирусы данного подтипа по-прежнему не претерпели существенных антигенных изменений с момента их первого появления в 2009 году, что показано на антигенной карте.

Вирусы гриппа B Викторианской разновидности циркулировали на всем протяжении эпидемического сезона и лишь в конце эпидемии был изолирован единственный штамм гриппа B Ямагатской разновидности. Все Викторианские изоляты текущего сезона реагировали в РТГА с антисывороткой к вакцинному штамму B/Брисбен/60/08 — до 1–½ гомологичного титра.

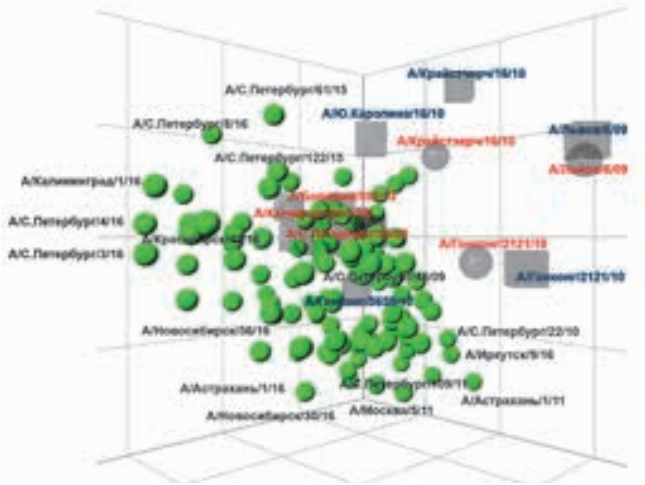


Рисунок. Антигенная карта для вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших в 2009–2016 гг.

Подобное взаимодействие установлено с антисыворотками к современным референс-вирусам B/Санкт-Петербург/144/13 и B/Иркутск/20/14, что свидетельствует об антигенной схожести данных штаммов. Возможно, что широкое распространение вирусов гриппа B данной линии обусловлено несоответствием вакцинного компонента по гриппу B, рекомендованного для Северного полушария на данный эпидемический сезон для тривалентных вакцин, наиболее распространенных в России: вирусы гриппа B были представлены штаммом Ямагатской разновидности.

Литература

1. *Соминина А. А., Коновалова Н. И. и др.* Выделение вируса гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация. Методич. рекомендации.— М., 2006.
2. *Даниленко Д. М.* Анализ эволюционной изменчивости и биологических свойств вирусов пандемического гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших в России в период с 2009 по 2013 гг. Автореф. дис. … канд. биол. наук.— СПб., 2014.

МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТИМУСНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ

К. В. Рутто, И. В. Кудрявцев, Е. П. Киселева
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

krispins-90@mail.ru

Введение. В настоящее время химио-, гормоно- и рентгенотерапия широко применяются для лечения онкологических больных. Данные воздействия вызывают инволюцию тимуса, сопровождающуюся снижением тимопоэза и развитием Т-клеточного иммунодефицита [1, 2]. Ведется поиск фармакологической коррекции подобных нарушений, к которым также относится повреждение тимусного эпителия. Для стимуляции эпителиального компартмента применяют фактор роста гепатоцитов (HGF) и фактор роста кератиноцитов (KGF). Предполагают, что оба эти фактора способны стимулировать пролиферацию эпителия тимуса [1, 2], однако механизм их действия до конца не ясен.

Целью нашей работы было изучение влияния HGF и KGF на пролиферацию эпителиальных клеток и экспрессию в них ангиогенного фактора, необходимого для восстановления сосудистой сети тимуса.

Материалы и методы исследования. Клеточные линии кортикального cTEC1–2 и медуллярного mTEC3–10 эпителия тимуса мыши были любезно предоставленны нам профессором M. Kasai из Токийского университета [3].

Метод обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) использовали для изучения экспрессии мРНК фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и рецептора HGF — c-Met, как описано ранее [4]. Для изучения c-Met использовали прямой 5´tgccagagacatgtacgataaag3´ и обратный 5´atggcaacagagaaggatatgg3´ праймеры (размер продукта 437 нп). В качестве гена сравнения использовали β-актин.

Проточную цитофлуориметрию использовали для определения поверхностной экспрессии c-Met на клетках эпителия с помощью моноклональных антител анти-c-Met-PE (eBioscience) и соответствующего изотипического контроля. Клетки снимали со дна флакона аккутазой. Обработку данных проводили при помощи программы Kaluza™ v.1.3 (Beckman Coulter).

Для оценки влияния HGF и KGF на пролиферацию эпителиальные клетки культивировали в течение 72 ч в присутствии исследуемых факторов и использовали три метода: с добавлением тетразолиевого реагента WST-1 (Roche), выявляющего количество метаболически активных клеток [1]; с окрашиванием монослоя клеток 0,05% метиленовым синим и путем подсчета числа клеток в камере Горяева.

Полученные результаты были статистически обработаны с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. В начале мы изучили, способны ли исследуемые нами клеточные линии экспрессировать рецептор HGF. С помощью ОТ-ПЦР мы обнаружили экспрессию мРНК c-Met в клетках обеих линий cTEC1–2 и mTEC3–10. Используя проточную цитофлуориметрию выявили 2,5% c-Met+ клеток среди cTEC1–2 и 12% среди mTEC3–10. Эти данные подтверждают результаты иммуногистохимического анализа [5]. Согласно данным литературы на эпителии тимуса мыши присутствует рецептор KGF — FGFR2IIIb [6].

Далее мы исследовали влияние KGF и HGF на пролиферативную активность эпителиальных клеток тимуса. При использовании WST-теста было показано, что HGF дозозависимо увеличивает метаболическую активность как кортикальных cTEC1–2, так и медуллярных mTEC3–10 эпителиальных клеток тимуса с максимальным эффектом при концентрации HGF 10 нг/мл (для cTEC1–2: 1,48±0,29 в контроле и 1,63±0,022 в опыте, $p<0,05$; для mTEC3–10: 2,03±0,04 в контроле и 2,49±0,10 в опыте, $p<0,05$; $n=12$). KGF, в отличие от HGF, стимулировал метаболическую активность только в клетках mTEC3–10 (0,74±0,01 в контроле и 0,87±0,02 в присутствии 100 нг/мл KGF, $p<0,01$; $n=12$). Результаты WST-теста были полностью подтверждены другими методами — путем окрашивания метиленовым синим и визуальным подсчетом клеток. При изучении экспрессии мРНК VEGF было показано, что HGF (10 нг/мл) не оказывал влияния как на cTEC1–2, так и на mTEC3–10 клетки, а KGF (100 нг/мл) стимулировал ее только в клетках mTEC3–10 (0,36±0,05 у.е. в контроле и 0,61±0,01 у.е. в опыте, $p<0,01$; $n=4$), не оказывая влияния на клетки cTEC1–2.

Данные о стимулирующем влиянии HGF на пролиферативную активность клеток линии cTEC1–2 и mTEC3–10 получены нами впервые и согласуются с результатами, полученными на другой линии кортикальных ретикулярных клеток эпителия тимуса CRECs [1]. Нами было впервые показано, что KGF стимулирует пролиферацию и экспрессию мРНК VEGF только в медуллярных клетках. Однако по данным литературы введение KGF взрослым мышам стимулирует как кортикальные, так и медуллярные клетки [6]. Данные различия, возможно, связаны с неонатальным происхождением исследуемых нами клеточных линий. Таким образом, механизм стимулирующего действия KGF и HGF различается, как по их влиянию на кортикальные и медуллярные клетки эпителия тимуса, так и по их воздействию на пролиферативную активность и синтез VEGF.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15–04–06150.

Литература

1. *Jung W.-S., Han S.-M., Kim S.-M. et al.* Stimulatory effect of HGF-overexpressing adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on thymus regeneration in a rat thymus involution model // Cell. Biol. Int.— 2014.— Vol. 38.— P. 1106–1117.
2. *Erickson M., Morkowski S., Lehar S. et al.* Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor // Blood.— 2002.— Vol. 100.— P. 3269–3278.

3. *Kasai M., Mizuochi T.* Culture and characterization of thymic epithelial cell lines // Meth. Mol. Biol.— 2007.— Vol. 380.— P. 107–123.
4. *Степанова О. И., Крылов А. В., Людыно В. И., Киселева Е. П.* Экспрессия генов VEGF-A и VEGF-C и их рецепторов в лимфоцитах и макрофагах мышей // Биохимия.— 2007.— Т. 72, № 11.— С. 1468–1473.
5. *Imado T., Iwasaki T., Kataoka Y. et al.* Hepatocyte growth factor preserves graft-versus-leukemia effect and T-cell reconstitution after marrow transplantation // Blood.— 2004.— Vol. 104.— P. 1542–1549.
6. *Rossi S., Jeker L., Ueno T. et al.* Keratinocyte growth factor (KGF) enhances postnatal T-cell development via enhancements in proliferation and function of thymic epithelial cells // Blood.— 2007.— Vol. 100.— P. 3803–3811.

ОЦЕНКА АНТИНЕЙРАМИНИДАЗНЫХ АНТИТЕЛ В КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЯХ ПРОТОТИПА ПАНДЕМИЧЕСКОЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПОДТИПА A(H7N9)

Т. А. Смолоногина, С. А. Донина, Ю. А. Дешева, Л. Г. Руденко
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

smolonogina@mail.ru

Введение. Возбудитель гриппа обладает высокой изменчивостью. Периодически появляются пандемически опасные вирусы ранее не циркулировавших среди людей подтипов. Так штаммы подтипа A(H7N9) впервые были выделены от человека в марте 2013 г. в Китае. К февралю 2015 г. в Китае зарегистрировано уже 571 лабораторно подтвержденных случаев инфицирования вирусом гриппа птиц A(H7N9), из которых 212 (37,1%) закончились летальным исходом. На настоящий момент штаммы вируса гриппа птиц A(H7N9) не способны к устойчивой трансмиссии среди человеческой популяции, однако рассматриваются ВОЗ в качестве пандемической угрозы.

Подготовка к возможной пандемии гриппа A(H7N9) включает в себя создание коллекций вакцинных штаммов, прошедших все надлежащие стадии доклинических/клинических испытаний и продемонстрировавших высокую иммуногенность. Созданный резерв позволит в случае необходимости в кратчайшие сроки начать производство вакцинных препаратов и масштабную иммунизацию населения. Необходимо учитывать, что обоснованное суждение об иммунологической эффективности вакцинации невозможно без расширения спектра анализируемых факторов адаптивного иммунного ответа у привитых, не ограничивающегося антителами лишь к одному из поверхностных антигенов вируса — гемагглютинину (HA).

Целью данной работы являлось исследование гуморального иммунного ответа к двум поверхностным антигенам вируса гриппа — нейраминидазе (NA) и HA — в клинических испытаниях моновалентной живой гриппозной вакцины (ЖГВ) против потенциально пандемического вируса гриппа A(H7N9).

Материалы и методы исследования. Объект исследования — сыворотки крови 39 волонтеров в возрасте 18–49 лет, которым двукратно интраназально с интервалом 28 дней вводилось 7,5 lgЭИД$_{50}$/0,5мл аттенуированного штамма A/17/Ануи/2013/61 (H7N9). Образцы сывороток крови вакцинированных лиц и волонтеров из группы плацебо собирали до прививки, на 28-й день после первой и второй иммунизации. Исследование образцов на наличие анти-NA и анти-HA антител проводили при помощи реакции ингибирования нейраминидазной активности (РИНА) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА) соответственно. Диагностический штамм вируса гриппа подтипа A(H6N9), обеспечивающий специфичность выявления в образцах сывороток крови антител к NA, был подготовлен методом классической генетической реассортации. Реассортант унаследовал ген HA от нерелевантного для человека вируса A/серебристая чайка/Сарма/51с/06(H6N1), NA — от штамма A/Ануи/1/2013(H7N9) и гены внутренних и неструктурных белков — от донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57(H2N2).

Результаты и их обсуждение. Ни у одного из 39 обследованных волонтеров до прививки не были выявлены антитела к N9 в тирах ⩾1:20. Обследованные добровольцы также не были иммунными к HA штамма A/Ануи/1/2013(H7N9). Таким образом, по результатам серологического исследования волонтеры в возрасте до 49 лет не имели контакта с потенциально пандемическим штаммом подтипа A(H7N9), а также не обладали гетеросубтипическим иммунитетом к рассматриваемому вирусу. Статистически значимый прирост титров анти-NA антител к вакцинному штамму был отмечен только на 28 день после двукратной иммунизации ЖГВ (см. табл.). Статистически значимый прирост титров анти-HA антител к штамму A/17/Ануи/2013/61(H7N9) наблюдался уже на 28 день после однократного введения ЖГВ. После первой прививки процент лиц с сероконверсией анти-NA, равно как и анти-HA антител составил 10,3%. Однако согласованность в приростах сывороточных антител к двум поверхностным антигенам вируса гриппа полностью отсутствовала. После ревакцинации процент лиц с сероконверсией анти-NA и анти-HA антител вырос до 17,2% и 65,5% соответственно. 48,3% (14 из 29) приходилось на долю лиц положительно ответивших выработкой антигемагглютинирующих, но не антинейраминидазных антител. При этом ни один из 29 двукратно вакцинированных не

Таблица

Формирование сывороточных антинейраминидазных и антигемагглютинирующих антител к штамму А/17/Ануи/2013/61(H7N9) у волонтеров 18–49 лет, двукратно привитых моновалентной ЖГВ

Группа	Число лиц	Среднегеометрический титр анти-NA антител (обратные величины)			Среднегеометрический титр анти-HA антител (обратные величины)		
		до вакцинации	после вакцинации	после ревакцинации	до вакцинации	после вакцинации	после ревакцинации
Вакцина	29	5,0[1]	5,5[2]	6,0[1,2]	3,0[3,4]	5,1[3,5]	10,2[4,5]
Плацебо	10	5,4	5,4	5,4	3,3	3,8	3,5

[1,2] — p=0,043; [3] — p=0,00009; [4] — p=0,00003; [5] — p=0,0001.

ответил приростом сывороточных антинейраминидазных антител в отсутствие сероконверсии антител к HA.

Заключение. Отсутствие гуморального иммунитета к NA и HA вируса гриппа птиц подтипа A(H7N9) среди лиц 18–49 лет указывает на восприимчивость рассматриваемой возрастной группы к инфекции и необходимость вакцинации в случае пандемической угрозы. При вакцинации волонтеров прототипом ЖГВ HA аттенуированного вируса A(H7N9) выступал в качестве иммунодоминантного антигена. Тем не менее, низкая степень согласованности сывороточного иммунного ответа к двум поверхностным антигенам вируса гриппа указывает на необходимость использования РИНА для более полной характеристики иммуногенности вакцинного препарата. Аналогичный факт уже был установлен в отношении реакции микронейтрализации, в отличие от традиционной РТГА выявившей 48% сероконверсий нейтрализующих антител уже после однократной вакцинации волонтеров ЖГВ подтипа A(H7N9) [1].

Литература

1. H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial / Rudenko L., Isakova-Sivak I., Naykhin A., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Korenkov D., Matyushenko V., Sparrow E., Kieny M P. // Lancet Infect Dis.— 2016.— Vol. 16, № 3.— P. 303–310.

РОЛЬ НЕЙТРОФИЛОВ В ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ РЕГУЛЯТОРНОГО РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА, КОНТРОЛИРУЮЩЕГО АУТОРЕАКТИВНОСТЬ

Е. Ю. Столярова, Л. В. Бедулева, К. М. Вахрушева, А. Р. Рамазанова
Удмуртский государственный университет, Ижевск, Россия

shima12@ya.ru

Введение. В недавно проведенных нами исследованиях был выявлен новый ранее не известный фактор негативной регуляции аутореактивности, препятствующий развитию аутоиммунных заболеваний [1]. Было показано, что этот фактор представляет собой антиидиотипические антитела к лимфоцитам против антигенов-индукторов аутоиммунных заболеваний и в то же время обладает специфичностью к Fc фрагментам гомологичного IgG. В связи с этим данный фактор регуляции получил название регуляторный ревматоидный фактор (РФрег). Исследование специфичности РФрег показало, что он имеет индивидуальный паратоп для узнавания антигенсвязывающего участка антител к антигенам-индукторам аутоиммунных заболеваний, а также общий паратоп, антигенные детерминанты для которого можно индуцировать на папаиновых Fc фрагментах гомологичного IgG [1]. При длительном наблюдении за уровнем РФрег в крови интактных животных было замечено, что его уровень может спонтанно, транзиторно повышаться. Данный факт наводит на мысль, что существует механизм эндогенной стимуляции активности пула лимфоцитов, продуцирующих РФрег, поддерживающий в активном состоянии систему контроля аутореактивности. Гипотеза нашего исследования предполагает, что поддержание активности пула лимфоцитов, продуцирующих РФрег, может обеспечиваться эндогенными папаин-подобными Fc фрагментами IgG, за образование которых может быть ответственна эластаза нейтрофилов, активируемых при физиологическом воспалении, которое сопровождает локальное повреждение тканей, контакт с инфекционными антигенами, дисбаланс условно патогенной микрофлоры и т.д.

Цель настоящей работы была исследовать влияние транзиторного воспаления на продукцию регуляторного ревматоидного фактора.

Материалы и методы. Воспаление вызывали внутрибрюшинным введением липополисахарида S. typhi (пирогенал, «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи») в дошоковой дозе — 2,5 мг/кг. Контрольным животным вводили стерильный физиологический раствор внутрибрюшинно. Еще одной группе крыс пирогенал в той же дозе вводили на фоне подкожного предъявления циклоспорина А (Сандиммун-Неорал, Novartis) в дозе 25 мг/кг в день в течение 5 дней, начиная с дня предшествующего дню введения пирогенала. Определяли количество нейтрофилов, уровень РФрег в крови и СОЭ на 1, 3, 7, 14, 21 день

после введения пирогенала. [1]. Для оценки достоверности различий использовали парный критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Обнаружено, что пирогенал вызывает статистически значимое увеличение уровня РФрег на 3 день после введения (t-test, $p<0,05$), (рисунок, *а*). У крыс, получивших физиологический раствор, повышения уровня РФрег не выявлено. Ранее было показано, что ЛПС при трехкратном введении в дозе 2,5 мг/кг вызывает повышение ревматоидного фактора [2], однако было не ясно, вызывает ли ЛПС продукцию регуляторного ревматоидного фактора.

На рисунке (*б*) видно, что повышению уровня РФрег, вызванного ЛПС, предшествовало транзиторное увеличение количества нейтрофилов в крови и СОЭ (рисунок, *в*). Таким образом выявлена ассоциация между продукцией РФрег и предшествующим ей повышением уровня нейтрофилов в крови. Данный факт говорит в пользу гипотезы об участии нейтрофилов в продукции РФрег. В то же время известно, что ЛПС являются поликлональным Т-независимым активатором В лимфоцитов. Поэтому повышение РФрег в ответ на введение пирогенала может быть результатом ЛПС-индуцированной пролиферации В лимфоцитов, а не активации нейтрофилов. Чтобы дифференцировать вклад этих механизмов в индукцию РФрег-продуцирующих лимфоцитов, одна из групп крыс получала пирогенал на фоне введения циклоспорина А (ЦсА), который обладает свойством подавлять активность нейтрофилов [3], но не влияет на ЛПС-индуцированную пролиферацию В-клеток [4]. Введение пирогенала на фоне предъявления ЦсА не вызвало продукции РФрег (рисунок, *а*), также не выявлено увеличения количества нейтрофилов (рисунок, *б*). Следовательно, повышение уровня РФрег, вызываемое ЛПС, является результатом активации нейтрофилов, а не поликлональной активации В-клеток.

Выводы. Таким образом, продукция РФрег может быть результатом ЛПС-индуцированного транзиторного воспаления. Ассоциация между продукцией РФрег и нейтрофилезом, а также отсутствие повышения РФрег при подавлении нейтрофилов циклоспорином А подтверждают гипотезу о ведущей роли нейтрофилов в поддержании уровня РФрег в крови.

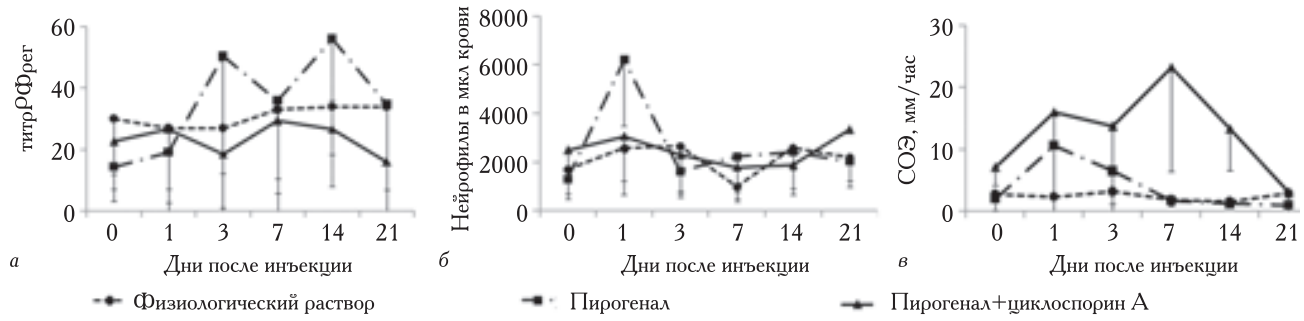


Рисунок. Титр РФрег (а), количество нейтрофилов (б), СОЭ (в) у крыс в ответ на введение пирогенала (n=10), пирогенала и ЦсА (n=9), физиологического раствора (n=9).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60164 мол_а_дк.

Литература

1. The rheumatoid factor in idiotypic regulation of autoimmunity / Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E., Fomina K., Lobanova O., Ivanov P., Terentiev A. // International Journal of Rheumatic Diseases.— 2015.— Vol. 18.— P. 408–420.
2. *Shozo I., Robert A. E., Frank J. D.* IgM rheumatoid factors in mice injected with bacterial lipopolysaccharides // The Journal of Immunology.— 1979.— Vol. 122.— P. 2096–2102
3. Latent inhibition of granulocyte function bycyclosporine A / Kolb G., Eckle I., Bitiner K., Muller T., Havemann K., Lange H. // Immunobiol.— 1990.— Vol. 181.— P. 22–30.
4. *Thomson A. W.* The effects of cyclosporine A on non-T cell components of the immune system // Journal of autoimmunity.— 1992.— Vol. 5.— P. 167–176.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ КРОСС-РЕАКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ ПРОТИВ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА РАЗНЫХ ПОДТИПОВ

И. А. Сычев, Т. А. Смолоногина, П. М. Копейкин, Ю. А. Дешева, Л. Г. Руденко
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

atheneem@yandex.ru

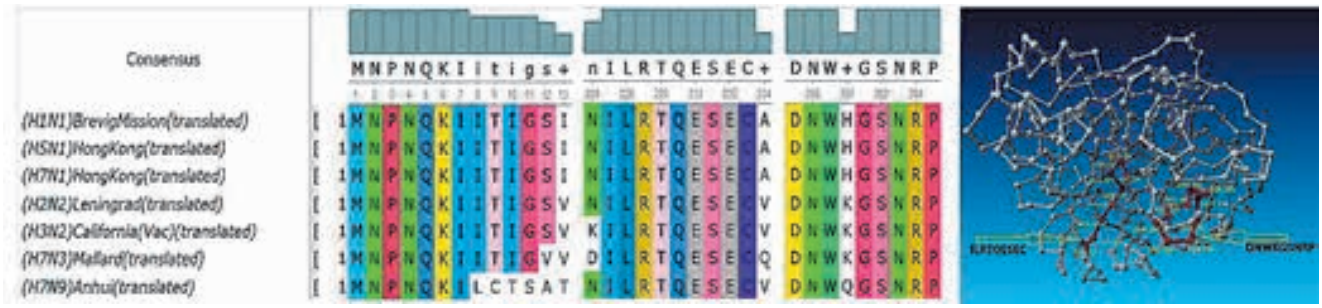
Введение. Изучение кросс-реактивности антител к различным подтипам нейраминидазы (NA) вируса гриппа является актуальным в свете угрозы появления в циркуляции штаммов, обладающих подтипами гемагглютинина (HA), иммунитет к которым у населения отсутствует. К таким штаммам относятся вирусы гриппа

птичьего происхождения A(H5N1) и A(H7N9), инфицирующие людей и претерпевающие генетические изменения, что может привести к возникновению нового пандемического штамма. В 2009 г. ВОЗ объявила о пандемии гриппа, вызванной вирусом гриппа A(H1N1)pdm. В отличие от предыдущих сезонных эпидемий, необычно тяжелая клиническая картина наблюдалась среди людей молодого и среднего возраста. Пожилые люди перенесли пандемию сравнительно легко, возможно из-за наличия перекрестно-реагирующих антител к вирусам A(H1N1), циркулировавшим до 1957 г. Целый ряд исследований показал наличие у части людей перекрестно-реагирующих антител к NA, образовавшихся в результате контактов с ранее циркулирующими вариантами [1]. Это может оказаться значимым в снижении смертности и ограничении распространения пандемии, вызванной вирусом гриппа с новым подтипом гемагглютинина. Несмотря на то, что в ряде исследований показаны кросс-реактивные свойства сывороточных антител, направленных против NA одного подтипа — N1, гетеросубтипические свойства антинейраминидазных антител до сих пор полностью не изучены.

Цель работы: изучение механизмов формирования гетеросубтипических перекрестно-реагирующих сывороточных антител против NA вирусов гриппа A различных подтипов. Для этого был проведен анализ консервативных B-клеточных эпитопов NA вируса гриппа подтипов N1, N2, N3 и N9 и осуществлен пептидный синтез de novo выявленных консервативных участков с целью определения их антигенной специфичности.

Материалы и методы. Компьютерный анализ проводили с помощью программного обеспечения (ПО) UGENE от Unipro [2] для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей вирусов гриппа A(H1N1), A(H5N1), A(H7N1), A(H2N2), A(H3N2), A(H7N3), A(H7N9), полученных из базы GeneBank. Дополнительно использовали ПО Yasara [3] для пространственной оценки расположения найденных консервативных последовательностей, а также ПО для предсказания линейных B-клеточных эпитопов [4]. Синтез пептидных последовательностей производился в Отделе общей патологии ФГБНУ «ИЭМ» с помощью Symphony X — Automated High-Throughput Multiple Peptide Synthesizer от Protein Technologies, Inc. Конъюгация полученных пептидов с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и овальбумином для оптимизации дальнейшей иммунизации экспериментальных животных производилась с помощью одноступенчатого глутаральдегидного метода. Для обеспечения оптимальных условий конъюгации пептида с белком-носителем на C-конец молекулы каждого пептида был добавлен остаток лизина. Оценка перекрестно-реагирующих свойств синтезированных пептидов проводилась в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) с гипериммунными сыворотками мышей.

Основные результаты. Данные компьютерного анализа представлены на рисунке.



а *б*

Рисунок. *а* — Результаты множественного выравнивания в UGENE; *б* — Пространственная модель глобулярной части мономера NA вируса A/Ленинград/134/17/57(H2N2).

На рисунке (*а*) показано множественное выравнивание аминокислотной последовательности нейраминидазы вируса гриппа A различных подтипов, выделенных от птиц и человека. Видна большая схожесть некоторых участков NA. На рисунке (*б*) изображены участки NA ILRTQESEC и DNWKGSNRP, располагающиеся рядом с активным центром.

Для дальнейшего углубленного анализа были выбраны участки MNPNQKIITIGS, ILRTQESEC, DNWKGSNRP, поскольку по данным компьютерного анализа и по литературным данным [5] они являются консервативными B-клеточными эпитопами. Результаты ИФА с сыворотками мышей, иммунизированных вирусами A/17/Калифорния/09/38(H1N1)pdm, NIBRG-23(H5N1), A/Ленинград /134/17/57(H2N2), A/17/кряква/Нидерланды/00/95(H7N3), A/17/Ануи/2013/61 (H7N9) показали, что пептид DNWKGSNRP в чистой форме и после конъюгации с БСА реагирует с сыворотками H7N9, H1N1, H5N2, H5N1, при этом с сыворотками неиммунизированных животных реагирование отсутствовало.

Заключение. Получены данные о гетеросубтипических антигенных свойствах одного из консервативных B-клеточных эпитопов NA вируса гриппа. Дальнейшая иммунизация животных синтезированными пептидами поможет изучить свойства антител к отдельным B-клеточным эпитопам, что в будущем может дать эффективный задел для разработки универсальной гриппозной вакцины.

Литература

1. *Дешева Ю. А.* Биологические и защитные свойства сывороточных антител к нейраминидазе вируса гриппа // Медицинский Академический Журнал.— 2015.— Т. 15, № 2.— С. 35.

2. *Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.* Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics.— 2012.— Т. 28, №. 8.— С. 1166–1167.
3. *Krieger E., Vriend G.* YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations // Bioinformatics.— 2014.— Т. 30, № 20.— С. 2981–2982.
4. *Davydov Y. I., Tonevitsky A. G.* Prediction of linear B-cell epitopes // Molecular Biology.— 2009.— Т. 43, № 1.— С. 150–158.
5. Qualitative and quantitative analyses of virtually all subtypes of influenza A and B viral neuraminidases using antibodies targeting the universally conserved sequences / Gravel C., Li C., Wang J., Hashem A. M., Jaentschke B., Xu K. W., … & Girard M. // Vaccine.— 2010.— Т. 28, № 36.— С. 5774–5784.

АНАЛИЗ РОСТОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВЕКТОРНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА

Т. С.Третяк, И. Н.Исакова-Сивак, Д. А.Кореньков, Т. А.Смолоногина, Л. Г.Руденко
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

tstretiak@gmail.com

Введение. Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является причиной инфекций нижнего респираторного тракта людей [1]. На протяжении 50 лет не удалось создать лицензированную вакцину против этого патогена. Для некоторых вирусов классические подходы создания вакцин оказываются неэффективными и небезопасными, к подобным вирусам можно отнести РСВ. Одним из перспективных подходов для создания вакцины против РСВ является использование холодоадаптированных (ХА) вирусов гриппа в качестве вектора для доставки антигенов РСВ в клетки-мишени. Использование ХА вирусов гриппа в качестве векторов имеет ряд преимуществ перед другими вирусами, в том числе: (i) отсутствие способности интегрироваться в геном клетки, поскольку в процессе его жизненного цикла нет стадии синтеза ДНК; (ii) индукция мощного гуморального и клеточного иммунного ответа после вакцинации; (iii) интраназальное введение вакцины (распылением в нос), которое является безболезненным и неинвазивным, а также способствует развитию мукозального иммунного ответа [2]. ХА вирусы гриппа являются основой для создания живой гриппозной вакцины (ЖГВ), которая успешно применяется в практике здравоохранения уже более 30 лет. Мы сконструировали экспериментальные векторные вакцины на основе ХА вирусов гриппа, несущие в своем составе иммунодоминантные эпитопы РСВ. Настоящее исследование направлено на изучение ростовых характеристик векторных вакцин против РСВ в системах *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы исследования. *Вирусы*. В данной работе изучались свойства трех векторных вакцин: (1) H7N9-HA/RSV; (2) H7N9-NA/RSV; (3) H7N9-HA/RSV+NA/RSV. Все рекомбинантные штаммы содержали внутренние и неструктурные белки от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). В качестве источника гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) был использован вирус А/Ануи/1/2013 (H7N9). В ген HA при этом была встроена последовательность, кодирующая нейтрализующий эпитоп РСВ-$F_{243-294}$, а в ген NA — фрагменты белков M2 и F, несущие Т-клеточные эпитопы РСВ, отобранные нами ранее [3]. В качестве контрольного вируса использовали вакцинный штамм подтипа H7N9 без вставок, полученный методами обратной генетики (H7N9 rg).

Оценка репродукции векторных вакцин в системе in vitro. Инфекционную активность вирусов оценивали путем их титрования на культуре клеток MDCK и в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) методом предельных разведений. Титры вирусов рассчитывали по методу Reed и Muench и выражали в виде $lgTCID_{50}$/мл и $lgEID_{50}$/мл, соответственно.

Оценка репродукции векторных вакцин in vivo. Мышей линии BALB/c заражали интраназально вирусами, взятыми в дозе 6,0 $lgEID_{50}$, в объеме 50 мкл. Титр вирусов в легких и носовых ходах мышей определяли путем титрования в РКЭ гомогенатов органов, взятых на 3-и сутки после заражения.

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты по репродукции векторных вакцин в системах *in vitro*, *in vivo* представлены в таблице. Все три векторные вакцины были способны инфицировать культуру клеток MDCK и РКЭ при 33° С. При этом одна вставка РСВ антигена в HA ген вируса гриппа не сказывалась на инфекционной активности вируса при данной температуре (см. вирусы H7N9 rg и H7N9-HA/RSV). Однако при встраивании РСВ антигенов в NA ген вируса происходило достоверное снижение инфекционной активности вирусов при 33° С, как в РКЭ, так и в культуре клеток MDCK (см. вирусы H7N9 rg, H7N9-NA/RSV и H7N9-HA/RSV+NA/RSV). Кроме того, вставка в NA негативно сказывалась на репродукции вирусов при пониженной температуре инкубации. Важно отметить, что все исследованные вирусы сохраняли температурочувствительный фенотип, плохо размножаясь при 38° С. Данный признак хорошо коррелировал с неспособностью вирусов размножаться в нижних дыхательных путях мышей. Примечательно, что вакцинные вирусы, содержащие вставку РСВ в NA, были способны активно размножаться в верхних дыхательных путях мышей, несмотря на их холодочувствительный фенотип.

Заключение. Представленные результаты являются первыми данными по оценке инфекционной активности *in vitro* и *in vivo* векторных вакцин против РСВ на основе

Таблица

Ростовые характеристики вирусов *in vitro* и *in vivo*

Исследуемый вирус	Титр вируса в РКЭ, $lgEID_{50}$/мл			Титр вируса в MDCK при 33° С, $lgTCID_{50}$/мл	Титр вируса в органах мышей, $lgEID_{50}$/мл	
	33° С	26° С	38° С		Носы	Легкие
H7N9 rg	8,5±0,4	6,5±0,7	1,7±0,8	7,7±0,4	2,4±0,5	≤1,2
H7N9-HA/RSV	9,0±0,6	6,3±0,2	2,9±0,5	8,1±0,2	2,7±0,7	≤1,2
H7N9-NA/RSV	7,5±0,4	3,1±2,0	2,1±0,1	6,4±0,3	4,5±0,4	≤1,2
H7N9-HA/RSV +NA/RSV	7,4±0,4	<2,2	2,2±0,5	6,5±0,5	2,8±0,6	≤1,2

ХА вирусов гриппа. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что вставка чужеродного антигена в NA вируса гриппа может оказывать влияние на ростовые характеристики векторной вакцины, тогда как вставка в HA не влияет на репродукцию вакцины *in vitro* и *in vivo*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-4969.2015.4.

Литература

1. *Dudas R., Karron R.* Respiratory Syncytial Virus Vaccines // Clin Microbiol Rev.— 1998 Jul.— Vol. 11 (3).— P. 430.
2. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment / Kittel C., Ferko B., Kurz M., Voglauer R., Sereinig S., Romanova J., Stiegler G., Katinger H., Egorov A. // J Virol.— 2005 Aug.— Vol. 79 (16).— P. 10672.
3. Поиск иммунодоминантных эпитопов респираторно-синцитиального вируса для конструирования векторных вакцин на основе вирусов гриппа / Исакова-Сивак И. Н., Кореньков Д. А., Федорова Е. А., Третяк Т. С., Матюшенко В. А., Смолоногина Т. А., Руденко Л. Г. // Бюлл. Эксп. Биол. Мед.— 2016.— Т. 161, № 4.— С. 523–527.

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ХИМЕРНЫХ МОЛЕКУЛ ГЕМАГГЛЮТИНИНА, СОДЕРЖАЩИХ ИММУНОГЕННЫЕ ЭПИТОПЫ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ В

Е. А. Федорова, И. Н. Исакова-Сивак, А. Н. Суворов, Д. А. Кореньков
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

fedorova.iem@gmail.com

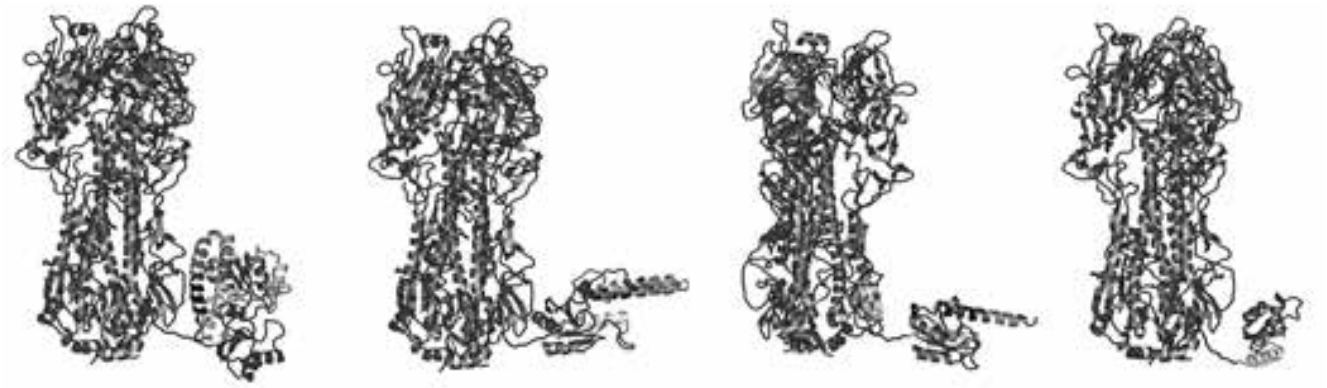
Введение. Стрептококки группы В вызывают ряд заболеваний человека, среди которых эндокардит, заболевания мочеполовой системы, сепсис рожениц и новорожденных. В связи с риском септических осложнений у лиц с ослабленной иммунной системой, разработка эффективных вакцин от данной группы микроорганизмов остается актуальной.

В качестве векторной системы для доставки антигенов стрептококка в клетки-мишени может быть использован штамм вируса гриппа [1]. Для получения безопасного и эффективного препарата оптимальным является использование в качестве вектора вакцинный штамм холодоадаптированной живой гриппозной вакцины.

Компьютерное моделирование пространственной структуры химерных молекул позволяет визуализировать разрабатываемые конструкции, оценить взаимное расположение разных функциональных доменов, а также выделить наиболее перспективные варианты на стадии теоретического планирования эксперимента. В данной работе представлено описание пространственных моделей химерного белка, состоящего из гемагглютинина (HA) реассортантного штамма живой гриппозной вакцины подтипа H7N9, на N-конец которого с использованием гибкого линкера длиной 7 аминокислот присоединены конструкции, содержащие иммунные эпитопы липопротеина ScaAB. Данный белок относится к семейству липопротеинов и металлотранспортеров, представлен на поверхности большинства патогенных стрептококков различных видов. Белок иммуногенен, а антитела к нему обладают выраженной протективностью как в отношении стрептококков группы А и В, так и пневмококков [2].

Материалы и методы исследования. Экспериментальные Т-клеточные эпитопы белка ScaAB, специфичные для мышей гаплотипа H-2(d), были проанализированы с помощью базы данных Immune Epitope Data Base (IEDB). Моделирование пространственной структуры молекул производилось по гомологии с известными структурами с использованием сервиса SWISS-MODEL [3]. Последовательность белка HA вакцинного штамма гриппа на основе вируса подтипа H7N9 была определена на основе последовательности гена, полученной в отделе вирусологии ФГБНУ «ИЭМ». Основой для построения модели была структура PDBID 1HA0. Конструкции домена на основе ScaAB смоделированы по гомологии со структурой PDBID 3HH8. На основе полученных с помощью гомологичного моделирования структур в программе USCF Chimera 1.10.2. [4] были визуализированы модели химерных конструкций.

Результаты и их обсуждение. В результате анализа расположения иммунных эпитопов в молекуле белка ScaAB были отобраны 4 кассеты, содержащие от двух до трех В-клеточных эпитопов ScaAB, а также ряд Т-клеточных эпитопов класса MHC I и MHC II, специфичных для мышей линии BALB/c. Наибольший участок насчитывает 287 аминокислотных остатков и имеет в составе 7 иммунных эпитопов. В связи с тем, что вероятность успеха получения химерной конструкции методами генной инженерии снижается с увеличением размера чужеродного фрагмента, мы произвели моделирование химерной молекулы гемагглютинина H7 с выбранным фрагментом ScaAB, присоединенным через гибкий линкер (AAAPGAA), а также тремя сокращенными вариантами данной конструкции (рисунок).



а *б* *в* *г*

Рисунок. Модель химерной конструкции на основе гемагглютинина вируса гриппа подтипа H7N9, к N-концу которого присоединен протеин, содержащий иммунные эпитопы белка ScaAB Streptococcus agalactiae. *а–г* — различные варианты домена, несущего эпитопы ScaAB.

Полная конструкция, содержащая максимальное количество (7) эпитопов ScaAB, по результатам визуализации кажется слишком крупной для встройки с использованием данного линкера (рис. *а*). С удалением двух эпитопов (199 аминокислотных остатков) крупные альфа-спиральные участки остаются в составе структуры (рис. *б*), поэтому ее получение также кажется маловероятным. Более перспективными представляются конструкции 3 и 4 (140 и 84 аминокислоты соответственно) (рис. *в*, *г*).

Заключение. Представлены пространственные модели химерных молекул гемагглютинина для получения рекомбинантной вакцины против гриппа и стрептококков группы В. Наиболее перспективными являются конструкции, содержащие сокращенные вставки в молекулу гемагглютинина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ НШ-9646.2016.7.

Литература

1. Retroviral display of functional binding domains fused to the amino terminus of influenza Hemagglutinin / Hatziioannou T., Delahaye E., Martin F., Russell S. J., Cosset F. L. // Hum Gene Ther.— 1999.— Vol. 10, № 9.— P. 1533–1544.
2. Рекомбинантные фрагменты консервативных белков СГВ как основа специфической вакцины / Мерингова Л. Ф., Суворов А. Н., Тотолян А. А., Леонтьева Г. Ф., Грабовская К. Б., Дуплик Н. В., Королева И. Н. // ЖМЭИ.— 2010.— Vol. 2.— P. 44–50.
3. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information / Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G, Schmidt T., Kiefer F., Gallo Cassarino T., Bertoni M., Bordoli L., Schwede T. // Nucleic Acids Res.— 2014.— Vol. 42.— P. W252–258.
4. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis / Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. // J Comput Chem.— 2004.— Vol. 25, № 13.— P. 1605–1612.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ, СОДЕРЖАЩИХ НУКЛЕОПРОТЕИН ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА

Э. А. Хайрушева, И. Н. Исакова-Сивак, Т. А. Смолоногина, Т. С. Третяк, Л. Г. Руденко
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

hai7elmira@yandex.ru

Введение. Современные живые гриппозные вакцины (ЖГВ) представляют собой реассортантные штаммы вируса гриппа, содержащие поверхностные антигены — гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA) — от актуального эпидемического вируса гриппа, а остальные шесть генов — от доноров аттенуации (формула генома 6:2). Донором аттенуации для отечественной ЖГВ типа А служит штамм А/Ленинград/134/17/57

Таблица

Ростовые характеристики исследуемых вирусов в РКЭ

Вирус	Титр вируса в РКЭ, lgЭИД$_{50}$/мл			Фенотип
	33° С	38° С	26° С	
H1N1 *wt*	8,0±0,5	8,2±0,1	2,8±0,7	*non-ts, non-ca*
H1N1 6:2	9,0±0,3	2,2±0,0	6,2±0,3	*ts, ca*
H1N1 5:3	7,9±0,2	2,1±0,1	4,9±0,7	*ts, ca*
H7N9 *wt*	9,0±0,6	9,0±0,5	3,5±0,8	*non-ts, non-ca*
H7N9 6:2	8,5±0,4	1,7±0,8	6,5±0,7	*ts, ca*
H7N9 5:3	9,0±0,3	2,6±0,7	6,8±1,0	*ts, ca*

(H2N2) (Лен/17), выделенный в 1957 г. и прошедший 17 пассажей при пониженной температуре инкубации. В результате чего вирус приобрел свойства температурочувствительности (*ts* фенотип), холодоадаптированности (*ca* фенотип) и аттенуации для человека.

Экспериментально установлено, что NP белок вируса гриппа содержит в своем составе большое число иммунодоминантных эпитопов для цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). NP белок подвержен медленным эволюционным изменениям, в результате чего современные вирусы гриппа А уже значительно отличаются по NP гену от донора аттенуации Лен/17, выделенного почти 60 лет назад, и ЦТЛ-иммунный ответ, сформированный на иммунизацию ЖГВ с формулой генома 6:2, уже неспособен адекватно защищать от актуальных вирусов гриппа А [1]. Решить проблему актуализации ЦТЛ-эпитопов в вакцинных штаммах ЖГВ можно путем включения в геном вакцинного вируса NP гена от эпидемического родителя, т.е. переходом с формулы генома 6:2 на 5:3. Включение в геном вакцинного штамма дополнительного гена от эпидемического вируса требует тщательного изучения биологических свойств новых вакцинных штаммов, в том числе их ростовых характеристик.

Материалы и методы. *Вирусы.* В работе использовали эпидемический вирус гриппа А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1), потенциально-пандемический вирус гриппа А/Ануи/1/2013 (H7N9), а также вакцинные реассортанты с формулами генома 6:2 и 5:3, подготовленные на их основе. Реассортанты 6:2 содержали HA и NA гены от вирулентного вируса, а остальные шесть генов — от донора Лен/17. Реассортанты 5:3 унаследовали HA, NA и NP гены от вирулентного вируса, а остальные пять генов — от донора Лен/17.

Оценка фенотипических характеристик вирусов. Активность репродукции вирусов гриппа при разных температурах (ts/ca фенотип) оценивали по результатам титрования методом предельных разведений в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ), инкубированных при температурах 26° С, 33° С, и 38° С. Титры вирусов рассчитывали по методу Reed и Muench и выражали в виде и lgEID$_{50}$/мл. Вирусы считали температурочувствительными (*ts* фенотип), если разница в титрах вируса при оптимальной и повышенной температуре составляла не менее 5,0 lgЭИД$_{50}$/мл, и холодоадаптированными (*ca* фенотип), если разница в титрах вируса при оптимальной и пониженной температуре не превышала 3,0 lgЭИД$_{50}$/мл.

Результаты и их обсуждение. В таблице представлены результаты оценки инфекционной активности исследуемых вирусов при оптимальной (33° С), повышенной (38° С) и пониженной (26° С) температурах инкубации. Из представленных данных видно, что все вакцинные штаммы, как с формулой генома 6:2, так и 5:3, характеризовались *ts* и *ca* фенотипом, то есть плохо размножались при повышенной температуре 38° С (1,7–2,6 lgЭИД$_{50}$/мл), при этом активно репродуцировались при низкой температуре 26° С (4,9–6,8 lgЭИД$_{50}$/мл). Контрольные вирулентные штаммы, наоборот, плохо росли при пониженной температуре, тогда как их инфекционные титры при 38° С были неотличимы от таковых при оптимальной температуре 33° С (8,2–9,0 lgЭИД$_{50}$/мл). Полученные данные указывают на то, что внесение в геном вакцинного штамма ЖГВ нуклеопротеина от эпидемического вируса не оказывает негативного влияния на *ts/ca* фенотип вакцинного вируса. Однако, несмотря на сохранность *ts/ca* фенотипа у вакцинных штаммов с формулой генома 5:3, инфекционная активность вакцинного вируса подтипа H1N1 была значительно ниже, чем у соответствующего реассортанта H1N1 с формулой генома 6:2 (ρ=0,014). Этот феномен был характерен только для вируса подтипа H1N1, тогда как вакцина подтипа H7N9 с формулой генома 5:3 не уступала по репродуктивным свойствам своему 6:2 аналогу.

Заключение. Введение в геном вакцинного штамма ЖГВ NP гена от актуального вируса может оказывать влияние на ростовые характеристики нового реассортантного штамма. При этом данный эффект является штаммо-специфичным и может быть разнонаправленным: у одних вирусов может снижаться активность репродукции при оптимальной и пониженной температурах, тогда как у других вирусов может наблюдаться усиление репродукции при этих температурах. И независимо от штамма, NP ген не оказывает влияние на *ts* фенотип вирусов, что является важным критерием обеспечения безвредности вакцинных штаммов ЖГВ с новой формулой генома.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант РНФ № 14-15-00034).

Литература

1. Сравнительный иммуноэпитопный анализ нуклеопротеинов современных циркулирующих вирусов гриппа А и донора аттенуации H2N2 для живой гриппозной вакцины / Кореньков Д. А., Исакова-Сивак И. Н., Кузнецова В. А., Лосев И. В., Руденко Л. Г., Найхин А. Н. // Фундаментальные Исследования.— 2014.— Vol. 10.— С. 908–912.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ФАРМАКОЛОГИИ И ФАРМАЦИИ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ И ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЙ ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ХИМИОПЕРФУЗИИ В ЛЕЧЕНИИ РАКА ЯИЧНИКА

И. К. Альвовский, Г. В. Точильников, В. Г. Беспалов
Научно-исследовательский институт онкологии им. Н. Н. Петрова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

ialvovsky@gmail.com

Рак яичника (РЯ) в большинстве случаев выявляют уже на поздних стадиях при появлении асцита, вызванного канцероматозом брюшной полости; стандартом лечения у таких больных является циторедутивная хирургия и системная химиотерапия с использованием препаратов платины и таксанов, результаты которого остаются неудовлетворительными [1], что говорит о необходимости поиска новых более эффективных методов и лекарственных препаратов для лечения диссеминированного РЯ. Большие надежды возлагаются на внутрибрюшинную (в/б) химиотерапию, позволяющую создавать в брюшной полости высокие концентрации препаратов. Основными режимами в/б введения препаратов являются интраперитонеальная химиотерапия (ИХТ) с помощью в/б катетера и прокачивание через брюшную полость с помощью насосов раствора с противоопухолевым препаратом, которое в свою очередь подразделяется на нормотермическую и гипертермическую интраперитонеальную химиоперфузию (НИПХ и ГИПХ) [2].

Цель работы. Проведение сравнительного анализа эффективности ИХТ и ГИПХ.

Материалы и методы. Для анализа были собраны данные семи независимых экспериментов, проведенных на модели перевиваемой асцитной опухоли яичника у 237 самок крыс Вистар. Противоопухолевые препараты цисплатин и диоксадэт вводили однократно в максимально переносимых дозах через 48 часов после в/б перевивки опухоли яичника, при ИПХ с помощью шприца — 4 и 1,5 мг/кг массы тела, при ГИПХ подогретый раствор (40–41° С) прокачивали специальным насосом — 20 и 15 мг/кг, соответственно. В контрольных группах крысам вводили в/б аналогичными путями физиологический раствор. Эффекты лечения оценивали по влиянию на выживаемость. Статистический анализ проводился с помощью классических частотных методов и верифицировался статистикой Бейса. Анализ данных осуществлялся с помощью программного обеспечения PAST, JASP, GPOWER [3–5].

Результаты и их обсуждение. Результаты представлены на рисунке.

ИХТ и ГИПХ как цисплатином, так и диоксадэтом статистически достоверно увеличивали выживаемость крыс в сравнении с соответствующими контрольными группами. Выживаемость при ГИПХ с диоксадэтом была достоверно выше по сравнению с ИХТ данным препаратом, что подтверждалось дисперсным анализом по Бейсу. Выживаемость при ГИПХ и ИХТ с цисплатином достоверно не различалась.

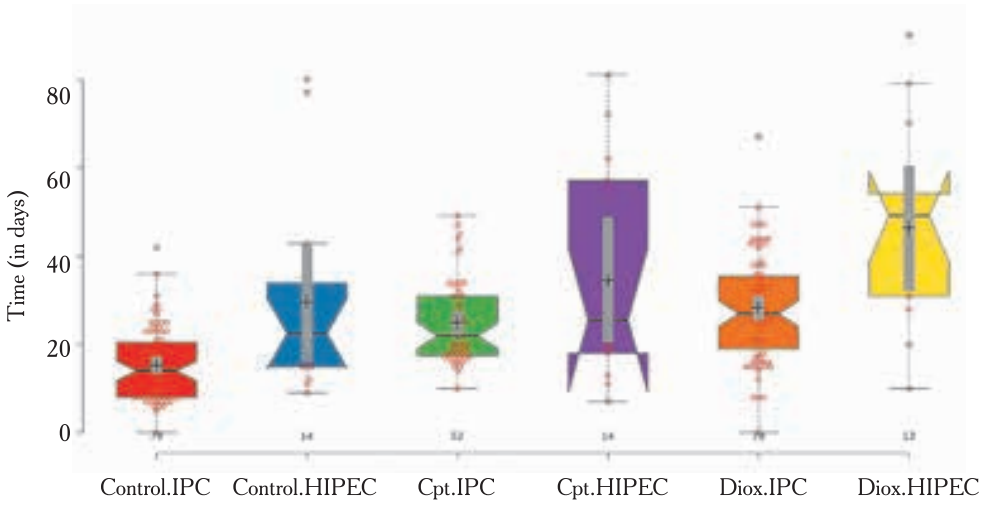


Рисунок. Сравнительный анализ выживаемости крыс с асцитной опухолью яичника при различных режимах внутрибрюшинной химиотерапии. Ось OX: Control — контроль, Cpt — цисплатин, Diox — диоксадэт, IPC — интраперитонеальная химиотерапия, HIPEC — гипертермическая интраперитонеальная химиоперфузия. Ось OY: Выживаемость в днях.

Заключение. Таким образом, ИХТ с цисплатином или диоксадэтом оказывают выраженное противоопухолевое действие на модели асцитной опухоли яичника у крыс. ГИПХ с диоксадэтом еще более усиливает эффективность лечения, однако при ГИПХ с цисплатином не наблюдается повышения противоопухолевого действия. Считается, что максимальная результативность химиоперфузии может достигаться в гипертермическом режиме за счет эффекта синергии высокой температуры и цитостатического действия препарата [6], но, вероятно, это может иметь место не для всех препаратов.

Литература

1. *Урманчеева А. Ф., Кутушева Г. Ф., Ульрих Е. А.* Опухоли яичника (клиника, диагностика и лечение).— СПб.: Н–Л, 2012.— 68 с.
2. Интраоперационное внутрибрюшинное химиоперфузионное лечение цисплатином и диоксадэтом на модели канцероматоза брюшной полости при раке яичника: оценка безопасности и эффективности / Беспалов В. Г., Киреева Г. С., Беляева О. А., Сенчик К. Ю., Стуков А. Н., Гафтон Г. И., Соловьев И. А., Васильченко М. В., Гусейнов К. Д., Алексеев В. В., Беляев А. М. // Вопр. онкол.— 2015.— Т. 61, № 4.— С. 647–652.
3. *Hammer Ø., Harper D., Ryan P.* PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis // Palaeontol. Electron.— 2001.— Vol. 4.— P. 4–9.
4. *Love J., Selker R., Marsman M., Jamil T., Dropmann D., Verhagen A. J., Wagenmakers E. J.* «JASP» Computer software.— Version 0.6.6.— 2015.
5. *Wasserstein R. L., Lazar N. A.* The ASA's Statement on p Values: Context, Process, and Purpose // Am. Stat.— 2016.— Vol. 70.— P. 129–133.
6. Химиоперфузионное лечение канцероматоза брюшины / Сенчик К. Ю., Беспалов В. Г., Стуков А. Н. Беляева О. А., Панченко А. П., Киреева Г. С., Аристова В. А., Трашков А. П. // Вестник Российской военно-медицинской академии.— 2013.— Т. 44, № 4.— С. 222–228.

ТРИЭТАНОЛАММОНИЕВАЯ СОЛЬ 1-ПРОПИЛИМИДАЗОЛ-4,5-ДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ: ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

[1,2]М. А. Брусина, [1]Д. Н. Николаев, [2]В. С. Фундаменский, [3]А. А. Золотарев, [1]А. М. Потапкин, [4]А. В. Селитреников, [2,4]Ю. А. Зевацкий, [2]С. М. Рамш, [1]Л. Б. Пиотровский

[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

[2]Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Россия

[3]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

[4]ЗАО «Новбытхим», Гатчина, Россия

mashasemen@gmail.com

Глутаматергическая система является основной системой возбуждения организма и участвует в процессах обучения и формирования памяти. Нарушение её действия может привести к развитию нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезни Альцгеймера, Хантингтона и др. Однако нарушения в работе глутаматергической системы можно нивелировать с помощью её регулирования лекарственными веществами [1]. Поэтому поиск новых веществ, регулирующих глутаматергическую систему, является одной из актуальных задач современных фармакологии и медицинской химии.

Ранее было показано, что производные имидазол-4,5-дикарбоновой кислоты (4,5-ИДК) являются лигандами NMDA-рецепторов, причем направленность действия (агонистическое или антагонистическое) зависит от липофильности молекулы. Исследования на изолированных пирамидных нейронах гиппокампа крысы показали, что одним из наиболее перспективных веществ является 1-пропилимидазол-4,5-дикарбоновая кислота (ИЭМ-1791) [2]. Однако исследования её фармакологических свойств затруднены низкой растворимостью в воде. Поэтому нами была получена водорастворимая форма — соль 1-пропил-4,5-ИДК с триэтаноламином (ИЭМ-2181) [3].

Цель работы: выявление особенности строения и исследование фармакологической активности триэтаноламмониевой соли 1-пропилимидазол-4,5-дикарбоновой кислоты.

Результаты и их обсуждение. Исследование фармакологической активности на модели судорог, вызванных внутрибрюшинным (в/б) введением N-метил-D-аспарагиновой кислоты (NMDA, 170 мг/кг) у мышей линии CBA показало, что ИЭМ-2181 (0,5 ммоль/кг, в/б) полностью купировал как наступление судорог, так и такие признаки NMDA-индуцированных судорог, как тремор и «дикий бег», то есть проявлял выраженное противосудорожное действие. Напротив, ИЭМ-1791 (0,5 ммоль/кг, в/б) вызывал увеличение частоты летальных исходов в 1,5 раза и сокращение латентного периода перед судорожной реакцией. Сравнение эффекта исследованных веществ показывает, что их действие на NMDA-рецептор противоположно: ИЭМ-2181 проявляет противосудорожные свойства, в то время как сама кислота ИЭМ-1791 — судорожные. Таким образом,

перевод 1-пропил-4,5-ИДК в водорастворимую форму — солеобразование с триэтаноламином привело к обращению фармакологического действия.

Наблюдаемое в эксперименте изменение фармакологического профиля вещества связано, по всей видимости, с тем, что в физиологической среде триэтаноламмониевая соль 1-пропил-4,5-ИДК может частично находиться в виде ионных пар и проникать через ГЭБ в виде ионного ассоциата. Размеры и геометрия ионной пары, а также зарядовое распределение в ней существенно отличаются от таковых для молекулы самой 1-пропил-4,5-ИДК, что, по-видимому, и играет ключевую роль в наблюдаемом обращении фармакологического эффекта.

Данная гипотеза была подтверждена с помощью кондуктометрического метода [4]. Было показано, что ИЭМ-2181 склонна к ассоциации даже в таком полярном растворителе, как вода. Константа нестойкости данной соли составляет 10^{-2}, что свидетельствует о том, что в водном растворе помимо диссоциированной формы молекулы существуют и нейтральные ионные ассоциаты.

Склонность ИЭМ-2181 к ассоциации обусловлена её уникальным строением. В анионе 1-пропил-4,5-ИДК присутствуют три акцептора — кислороды карбонильных групп C(4)'=O, C(5)'=O и циклический азот N(3). С другой стороны, триэтаноламмониевый катион имеет три гидроксильные группы, которые являются донорами. Благодаря такому строению катионы триэтаноламина и анионы кислоты удерживаются вместе большим количеством внутри- и межмолекулярных водородных связей, о чем свидетельствуют и данные рентгеноструктурного анализа.

Заключение. Таким образом, триэтаноламмониевая соль 1-пропил-4,5-ИДК существует в виде крупного ионного ассоциата даже в таком полярном окружении, как физиологическая среда. Данный ассоциат хорошо растворим в воде, и, в отличие от соответствующей кислоты, обладает не судорожным, а противосудорожным действием.

Литература

1. *Беспалов А. Ю., Звартау Э. Э.* Нейропсихофармакология антагонистов NMDA-рецепторов.— СПб.: Невский Диалект, 2000.— 297 с.
2. *Пиотровский Л. Б., Думпис М. А., Блохина Е. А., Беспалов А. Ю.* Актуальные вопросы профилактики и терапии интоксикаций.— СПб.: Астерион, 2005.— 116 с.
3. *Брусина М. А., Пиотровский Л. Б., Рамш С. М., Николаев Д. Н.* Создание водорастворимой формы 1- и 2-алкилзамещенных имидазол-4,5-дикарбоновых кислот // Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии.— 2015.— Т. 13, спецвыпуск.— С. 22–23.
4. *Зевацкий Ю. А., Селитреников А. В.* Кондуктометрия растворов очень слабых электролитов и двухосновных кислот // ЖОХ.— 2013.— Т. 83, № 5.— С. 745–753.

ИЗУЧЕНИЕ НЕФРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ АЛЬФА-1 КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА НА МОДЕЛИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПОЧЕК

П. В. Буренков, И. Е. Макаренко, М. Н. Макарова

Санкт-Петербургский институт фармации, Ленинградская область, Россия

spbpharm@mail.ru

Острая почечная недостаточность (ОПН) — внезапное нарушение функции почек со снижением процессов фильтрации и реабсорбции, приводящее к расстройству водного, электролитного, азотистого и других видов обмена. Учитывая высокий уровень летальности при развитии ОПН и вызываемых ею осложнений, важной задачей для современной медицины является разработка и внедрение в клиническую практику препаратов, способных оказывать терапевтический эффект на течение ОПН.

Альфа-1 кислый гликопротеин (АГП) является белком острой фазы, способным стабилизировать мембраны эндотелиоцитов, повышая метаболическую функцию эндотелия [1]. Также АГП участвует в регуляции проницаемости сосудистой стенки и реологических свойств крови [2]. Для подтверждения гипотезы о влиянии АГП на микроциркуляцию была выбрана модель ишемии-реперфузии почек, при которой имеется возможность оценить состояние гемодинамики клубочкового аппарата почек.

Цель работы. Исследование нефропротекторных свойств АГП на модели ишемии-реперфузии почек.

Материалы и методы. Эксперимент был проведен на 112 крысах-самцах линии Wistar 250–300 г. Экспериментальную патологию ишемии-реперфузии почек моделировали согласно методике Kidney Ischemia-Reperfusion — K I/R [3].

АГП был протестирован в 3 экспериментальных дозах: 233 мг/кг (1/3 от высшей терапевтической дозы (ВТД)), 466 мг/кг (2/3 ВТД), 700 мг/кг (1 ВТД), референтный препарат Актовегин исследовали в дозе 80 мг/кг (1 ВТД). Препараты вводили внутривенно, в два этапа: за 10 минут до освобождения от механического пережатия сосудистого пучка почки и через 30 минут после начала реперфузии. Эффективность действия препарата оценивали по биохимическим показателям крови — уровень креатинина и мочевины, а также проводили гистологическое исследование почек. Венозную кровь для исследования забирали у животных через 24 часа от момента реперфузии. Для гистологической обработки ткани образцы почек по общепринятой методике очищали, заливали в парафин, нарезали, окрашивали гематоксилином и эозином и микроскопировали. Критериями гистологической оценки служили: наличие поражения системы канальцев, наличие тубулярного некроза и воспалительной инфильтрации. Степень выраженности признаков оценивалась в баллах от 1 до 4.

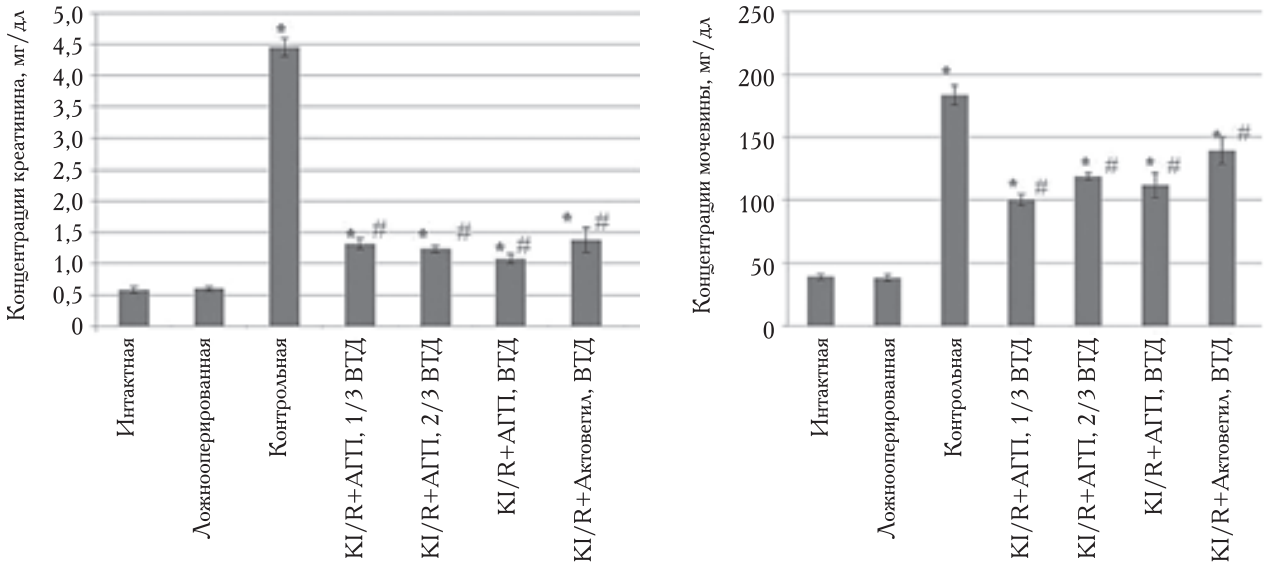


Рисунок. Уровень мочевины и креатинина крови животных через 24 часа после начала реперфузии.

Примечания: * — отличия статистически значимы в сравнении с интактной группой, $p<0,05$, критерий Тьюки. # — отличия статистически значимы в сравнении с контрольной группой, $p<0,05$, критерий Тьюки.

Результаты и их обсуждение. В результате исследования была воспроизведена адекватная экспериментальная модель острой почечной недостаточности, что подтверждалось повышением уровня креатинина в 9 раз и мочевины в 4 раза у животных контрольной группы относительно интактной и ложнооперированной групп. На фоне развившейся патологии установлено наличие нефропротекторного действия АГП, что подтверждалось снижением концентрации креатинина и мочевины на 70% и 35% соответственно, при этом не было отмечено достоверных различий по эффективности исследованных доз АГП, что говорит о широте терапевтического действия данного препарата. Аналогичный эффект оказал и Актовегин — на фоне его введения отмечали снижение уровня креатинина на 70% и мочевины на 20%. Таким образом, эффекты препаратов были сопоставимы.

При гистологическом исследовании почек животных контрольной группы отмечали острый тубулярный некроз с воспалительной инфильтрацией (соответствует 4 баллам). Гистологическое исследование почек крыс, получавших экспериментальные препараты, выявило поражение менее 1/3 канальцевого аппарата (1 балл).

Заключение. Таким образом, установлено, что АГП проявляет нефропротекторный эффект. Один из возможных механизмов нефропротекторного действия АГП заключается в наличии у него антиагрегантных свойств, которые обусловлены способностью АГП к донорству сиаловых кислот, входящих в его состав на концевых участках углеводной части молекулы. Встраиваясь в структуры клеточных мембран, сиаловые кислоты приводят к увеличению общего отрицательного заряда мембран тромбоцитов, перицитов и клеток эндотелия более крупных сосудов, что в итоге приводит к снижению микротромбообразования.

Литература

1. *Sörensson J., Matejka G. L., Ohlson M., Haraldsson B.* Human endothelial cells produce orosomucoid, an important component of the capillary barrier // Am. J. Physiol.— 1999.— Vol. 276, № 2.— P. H530–H534.
2. *Макаров Е. В., Кривохижина Л. В.* Альфа-1-кислый гликопротеин, реактант острой фазы воспаления, как важный гомеостатический фактор организма: обзор литературы // Вестник Южно-Уральского государственного университета.— 2005.— № 4.— С. 44.
3. Antibodies to ICAM-1 protect kidneys in severe ischemic reperfusion injury / Rabb H., Mendiola C., Saba S., Dietz J., Smith C., Bonventre J., Ramirez G. // Biochem Biophys Res Commun.— 1995.— Vol. 211, № 1.— P. 67–73.

ОЦЕНКА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ КОМБИНАЦИИ ЭКСТРАКТОВ ТИМЬЯНА И ПЛЮЩА НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЛЕГКИХ У КРЫС

Е. А. Вахромова, К. Л. Крышень, М. Н. Макарова
Санкт-Петербургский институт фармации, Ленинградская область, Россия

spbpharm@mail.ru

Введение. В настоящее время на фоне развития фармакологической отрасли постепенно возрастает интерес к получению новых фармакологически активных субстанций природного и, в частности, растительного происхожде-

ния. Так, при лечении острых форм ряда патологий дыхательных путей все чаще применяют различные экстракты, полученные из растительного сырья, и их комбинации, что, соответственно, требует тщательной оценки эффективности этих лекарственных средств, их противовоспалительной, противокашлевой и иной специфической активности.

Цель работы. Оценка противовоспалительной активности фиксированной комбинации экстрактов тимьяна и плюща (ТПЭ) на модели острого воспаления легких у крыс.

Материалы и методы. В работе использовали самцов крыс линии Wistar. Острое воспаление легких у животных индуцировали однократным эндотрахеальным введением 100 мкг липополисахарида (ЛПС) бактерий *Escherichia coli* на животное. ТПЭ вводили животным с помощью зонда для внутрижелудочного введения, один раз в день в трех дозах — 1,7; 5,0 или 16,7 мл/кг — в течение трех дней после индукции патологии. В качестве препарата сравнения использовали дексаметазон в дозе 5 мг/кг при внутримышечном введении. Оценку выраженности воспаления проводили после эвтаназии животных соответствующих групп через 48 и 72 часа после введения ЛПС по показателям: степень гранулоцитарной инфильтрации в бронхи; уровень лейкоцитов в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ); степень гиперплазии бокаловидных клеток в бронхиальном эпителии.

Результаты и их обсуждение. Эндотрахеальное введение ЛПС вызывало выраженные морфофункциональные изменения в ткани легких. К 48 часам после введения ЛПС у животных была отмечена выраженная гиперплазия слизистой бронхиального эпителия. Число секрет-содержащих бокаловидных клеток (дающих положительную окраску на альциановый синий) в бронхах среднего размера к указанному сроку значительно возрастало по сравнению со здоровыми животными (таблица).

Гранулоцитарная инфильтрация в слизистый и подслизистый слой бронхов через 48 часов после введения ЛПС также достоверно возрастала (по сравнению с контролем). Степень клеточной инфильтрации в легкие после однократного введения ЛПС находилась в пределах от умеренной до тяжелой. Выраженная инфильтрация клеток иммунной системы к очагу воспаления вследствие введения ЛПС приводила к значительному увеличению концентрации этих клеток в БАЛ. Через 48 часов после индукции патологии общее число лейкоцитов возрастало более чем в 4 раза относительно уровня здоровых животных. Описанная картина сохранялась до 72 часов после однократного введения ЛПС.

Дексаметазон в дозе 5 мг/кг обладал значительным противовоспалительным действием, подавляя гранулоцитарную инфильтрацию в легкие и гиперплазию бокаловидных клеток, а также значимо ослабляя ЛПС-индуци-

Таблица

Оценка выраженности воспалительного процесса по показателям на модели ЛПС-индуцированного острого воспаления легких у крыс

№ п/п	Характеристика группы	День эвтаназии / Показатель			
		Число бокаловидных клеток на 1 мм эпителия	Гранулоцитарная инфильтрация в слизистый слой, баллы	Гранулоцитарная инфильтрация в подслизистый слой, баллы	Концентрация лейкоцитов в БАЛ, $\times 10^6$ клеток/мл
48 часов после введения ЛПС					
1	Здоровый контроль	28,0±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	1,2±0,1
2	Негативный контроль	55,6±3,9$^{\#}$	1,2±0,2§	1,2±0,2§	5,2±0,7$^{\#}$
3	Дексаметазон, 5 мг/кг	50,5±3,3	0,7±0,2	0,3±0,2	1,2±0,2***
4	ТПЭ, 1,7 мл/кг	58,3±3,1	0,8±0,3	0,5±0,3	5,1±0,6
5	ТПЭ, 5,0 мл/кг	52,8±2,2	0,6±0,2	0,3±0,2	2,6±0,5**
6	ТПЭ, 16,7 мл/кг	50,0±1,6	0,3±0,2	0,3±0,2	2,9±0,5*
72 часа после введения ЛПС					
7	Негативный контроль	63,7±1,7$^{\#}$	1,5±0,3§	1,3±0,3§	3,5±0,8$^{\#}$
8	Дексаметазон, 5 мг/кг	49,2±2,7**	0,2±0,2†	0,0±0,0†	1,1±0,4**
9	ТПЭ, 1,7 мл/кг	47,5±3,5**	0,3±0,2†	0,3±0,2	2,2±0,4
10	ТПЭ, 5,0 мл/кг	44,6±3,6***	0,8±0,3	0,6±0,4	1,5±0,2*
11	ТПЭ, 16,7 мл/кг	42,4±1,6***	0,4±0,2	0,2±0,2	1,7±0,4*

Примечания:

1) Здоровый контроль — без патологии, негативный контроль — без терапии;

2) n=6 при оценке концентрации лейкоцитов в БАЛ, n=4–6 при анализе степени гиперплазии эпителия бронхов и гранулоцитарной инфильтрации в легкие;

3) $^{*}p<0,05$; $^{**}p<0,01$; $^{***}p<0,001$; однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), тест Дуннета в сравнении с соответствующей группой негативного контроля;

4) $^{\#}p<0,05$; тест Стьюдента, коррекция Уэлча в сравнении с группой здорового контроля;

5) $^{\dagger}p<0,05$; критерий Краскела-Уоллиса, тест Дунна в сравнении с соответствующей группой негативного контроля;

6) $^{\S}p<0,05$; тест Манна-Уитни в сравнении с группой здорового контроля;

7) 0±0 — не выявлено.

рованное нарастание концентрации лейкоцитов, оцененной в БАЛ.

Многократное введение ТПЭ во всех трех дозах животным привело к значительному подавлению ЛПС-индуцированной гранулоцитарной инфильтрации в бронхи. Наибольший эффект был достигнут при введении ТПЭ в дозе 16,7 мл/кг через 48 часов после введения ЛПС. Эффективное подавление ЛПС-индуцированного воспаления вследствие введения ТПЭ в исследуемых дозах также было установлено по достоверно меньшему нарастанию уровня лейкоцитов в БАЛ. Через 48 и 72 часа после индукции патологии значимый ингибирующий эффект был обнаружен при введении ТПЭ в средней и высшей дозе. При оценке степени гиперплазии бокаловидных клеток в бронхиальном эпителии легких отмечено значимое подавление разрастания секретирующего компонента ткани органа (то есть достоверно меньшее число секрет-содержащих бокаловидных клеток) вследствие многократного введения ТПЭ во всех трех дозах в сравнении с животными соответствующей группы негативного контроля.

Заключение. Таким образом, используя модель острого ЛПС-индуцированного воспаления легких у крыс, установили, что фиксированная комбинация ТПЭ обладает выраженным противовоспалительным действием и в значительной степени снижает гиперплазию бокаловидных клеток в бронхиальном эпителии ткани легких.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НОВОГО ТРИПЕПТИДА НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРЫСАХ

Е. Г. Григорьева, Н. А. Купцов, В. О. Лимаренко, Н. Е. Тимофеев, Ш. Ш. Шихмагомедов
Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

elenaexcelent@gmail.com

Решение проблем нормализации мозговой деятельности, улучшения памяти и внимания, повышение когнитивных функций после повреждающего нейроны воздействия очень актуально в настоящее время. Ноотропы и нейроцитопротекторы — одни из современных медикаментозных средств пептидной структуры, используемые в этих целях, и значимость их исследования, как новых лекарственных средств, не вызывает сомнений.

Цель работы. Экспериментальное исследование влияния комбинации пропофола и севофлурана на состояние когнитивного статуса в эксперименте на крысах, а также изучение влияния на когнитивные функции ноотропного препарата, нового трипептида, (Arg-Glu-Asp).

Материалы и методы. Опыты выполнены в хроническом эксперименте на 40 крысах линии Вистар весом 250±15 г. Животные были разделены на 4 группы: первая группа — интактная (введение физиологического раствора); вторая группа — животные, получавшие трипептид в дозе 5 мг/кг; третья группа — введение наркоза и физиологического раствора; четвертая группа — применение наркоза и трипептида в дозе 5 мг/кг. Курс инъекций трипептида составлял 5 дней [1, 2]. В качестве наркоза животным вводили пропофол в дозе 10 мг/кг [3] и севофлуран 6 мл (в течение 60 мин) [4]. Для оценки состояния когнитивных функций у крыс был использован тест «Открытого поля» [5]. Животное помещали в центр хорошо освещенной квадратной арены площадью 0,64 м^2, стенками высотой в 0,2 м, с полом, расчерченным на 16 квадратов, и в течение 3 мин подсчитывали количество посещений центральных и периферических квадратов, пристеночных и центральных стоек, груминг, дефекацию и мочеиспускание. Для проведения теста «Foot fault» животное помещали в установку с решетчатым полом с отверстиями 14×2 см, и в течение 2 мин подсчитывали количество «проваливаний» лап. Измерения с помощью тестов «Открытое поле» и «Foot fault» проводились в следующем порядке: за 24 ч до наркоза, через 30 мин, 1 ч и 24 ч после наркоза, после трех дней введения препаратов, а также в течение трех дней после их отмены. Данные обрабатывали с помощью программы Excel. Высчитывали величину стандартного отклонения.

Результаты и их обсуждение. У животных, которые не подвергались действию наркоза, при исследовании в «Открытом поле» наблюдалось достоверное увеличение горизонтальной и вертикальной активности после курса трипептида: средний показатель вертикальной активности после введения препарата превышал таковой у интактной группы на 20%, а средний показатель горизонтальной активности — на 28% ($p<0,05$). Среднее число проваливаний у крыс в «Foot fault» тесте, которые получали препарат, было ниже на 30% ($p<0,05$). В ходе эксперимента с использованием комбинированного наркоза было выявлено, что у всех животных 3-й (без лечения) и 4-й (с лечением) групп после применения общих анестетиков в тесте «Открытого поля» снижается количество посещений периферических и центральных квадратов, количество стоек, частота груминга по сравнению с интактной. В группе без лечения на 8-й день после наркоза выше указанные показатели теста снизились на 90% ($p<0,05$), в группе с лечением через 24 ч после наркоза наблюдались те же тенденции. Но после применения трипептида посещение центральных квадратов достоверно увеличилось на 43%, посещение периферических квадратов — на 13%, количество стоек — на 18%, частота груминга возросла на 35%. В «Foot fault» тесте уменьшается количество «провалов»: в 3-й группе на 62%, в 4-й группе на 90% ($p<0,05$).

Заключение. Признаки послеоперационной когнитивной дисфункции могут быть корректированы с помощью использования ноотропных средств. Введение трипептида

(Arg-Glu-Asp) привело к усилению и восстановлению когнитивных функций после наркоза при максимальном эффекте через три дня после пятидневного курса введения препаратов. Нейроцитопротекторное действие нового трипептида проявлялось повышением сенсомоторной координации, отмеченной в тесте с проваливанием, и исследовательско-ориентоpовочного рефлекса, достоверно увеличившего горизонтальную и вертикальную активность.

Литература

1. Влияние пинеалона на нейробиологические показатели крыс разного возраста / Карантыш Г. В., Менджерицкий А. М., Прокофьев В. Н., Косенко Ю. В., Рыжак Г. А. // Scientific and Practical Journal of Health and Life Sciences.— 2014.— № 4.— С. 35–42.
2. *Козина Л. С., Арутюнян А. В., Стволинский С. Л., Хавинсон В. Х.* Оценка биологической активности регуляторных пептидов в модельных экспериментах in vitro // Успехи геронтол.— 2007.— Т. 21, № 1.— С. 68–73.
3. Oleuropein attenuates cognitive dysfunction and oxidative stress induced by some anesthetic drugs in the hippocampal area of rats / Alirezaei M., Rezaei M., Hajighahramani S., Sookhtehzari A., Kiani K. // J. Physiol. Sci.— 2016.— Mar 29.
4. *Liu S. Y., Wang H. B., Wang H. Y., Wang G. L.* Effect of sub-anesthetic doses of isoflurane and propofol on postoperative cognition and underlying mechanism in rats with mild cognitive impairment // Zhonghua Yi Xue Za Zhi.— 2016.— № 2.— С. 142–146.
5. *Хабриев Р. У.* Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.— М.: Медицина, 2005.— 832 с.

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВОЙ ТЕРАПИИ ЭНДОГЕННЫХ ИНФЕКЦИЙ НИЖНЕГО ОТДЕЛА ПОЛОВЫХ ПУТЕЙ У КУРСАНТОВ ЖЕНСКОГО ПОЛА ВЫСШИХ ВОЕННО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ МО РФ

А. Ю. Гурджиева, А. А. Шмидт, С. В. Бескровный, А. М. Иванов, М. Т. Алиева
Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

anna-gurd@yandex.ru

По данным литературы, несмотря на возможности современных методов диагностики и лечения, эндогенные инфекции нижних отделов половых путей продолжают занимать ведущее место в структуре акушерско-гинекологической патологии. Одним из основных факторов, способствующих возникновению и рецидивирующему течению, воспалительных и дисбиотических заболеваний, является снижение эффективности защитных механизмов местного иммунитета [1]. Данные патологические изменения обусловлены хроническим психологическим стрессом, повышенными физическими нагрузками, погрешностями в соблюдении личной гигиены, что зачастую является следствием военно-профессиональной деятельности, особенно при выполнении задач в полевых условиях [2]. Определенную группу риска составляют курсанты женского пола высших военно-образовательных организаций МО РФ (ВВОО МО РФ) [3]. По результатам ретроспективного анализа медицинской документации курсантов женского пола ВВОО МО РФ, проходивших диспансеризацию на базе клиники акушерства и гинекологии ВМедА им. С. М. Кирова в период 2010–2015 гг., отмечена тенденция к увеличению доли воспалительных и дисбиотических заболеваний нижнего отдела половых путей в структуре общей гинекологической патологии — с 26,2% в 2010 г. до 58,1% в 2015 г.

Цель работы. Проведение сравнительного анализа эффективности лечения бактериального вагиноза и неспецифического вагинита у курсантов женского пола ВВОО МО РФ бактериофаговым (БФ) и комбинированным антибиотик-содержащим (АБ) препаратами, для возможной коррекции схем терапии эндогенных инфекций нижнего отдела половых путей.

Материалы и методы. В исследовании участвовало 28 курсантов с диагнозом бактериальный вагиноз и 44 курсанта с диагнозом неспецифический вагинит. Верификация диагноза и динамическая оценка эффективности лечения проводилось на основании клинических данных, микроскопической картины мазков и pH-метрии отделяемого из влагалища, а также с применением методов идентификации нуклеиновых кислот: ПЦР в режиме реального времени на возбудители инфекции, передаваемые преимущественно половым путем и ПЦР-Фемофлор16. В одной группе терапия проводилась поливалентным бактериофагом в гелиевой форме, по схеме — 5 мл геля интравагинально 2 раза в день (утром и вечером) в течение 7 дней (далее — группа 1-БФ). В другой группе — комбинированным антибактериальным препаратом широкого спектра действия в таблетированной форме, по схеме — 1 таблетка интравагинально на ночь в течение 7 дней (далее — группа 2-АБ). Дополнительно, в обеих группах применялся эубиотический препарат, содержащий лиофилизированные молочнокислые бактерии– перорально по 2 капсулы 3 раза в день в течение 10 дней.

Результаты и их обсуждение. При анализе эффективности лечения бактериального вагиноза через 1 месяц по окончании терапии, нормализация биотопа влагалища и отсутствие симптомов заболевания отмечено у 78,6% пациенток в группе 1-БФ и у 85,7% пациенток в группе 2-АБ. При сопоставимой эффективности обоих препара-

тов, в группе 2-АБ снижение выраженности клинической симптоматики отмечено в более короткие сроки, так на 3-й день лечения характерная клиническая картина сохранялась у 14,2% пациентов из группы 2-АБ и у 85,7% пациентов из группы 1-БФ. При лечении неспецифического вагинита БФ препаратом положительный эффект отмечен в 81,9% случаев (при оценке эффективности через 1 месяц по окончании терапии). Снижение интенсивности выраженности клинической симптоматики в обеих группах было практически идентичным, за исключение явления диспареунии которое сохранялось на протяжении более длительного времени у пациенток в группе 2-АБ.

При лечении как бактериального вагиноза, так и неспецифического вагинита, в группе пациенток, получавших АБ-препарат, отмечена более ранняя элиминации возбудителей, однако в группе, получавших БФ-препарат, нормализация качественных и количественных показателей биотопа влагалища происходила эффективнее и в более короткие сроки.

Заключение. Таким образом наибольшую эффективность при лечении бактериального вагиноза и неспецифического вагинита проявила бактериофаговая терапия. Избирательность действия бактериофагов на патогенные микроорганизмы без отрицательного воздействия на лактобактерии приводит к сохранению и поддержание нормального биотопа влагалища. Поэтому именно данный метод терапии может быть рекомендован к применению для лечения и профилактики дисбиотических и воспалительных заболеваний влагалища, обусловленных условно-патогенными микроорганизмами, на этапах оказания специализированной гинекологической помощи военнослужащим женского пола.

Литература

1. Гинекология. Национальное руководство / ред. В. И. Кулакова, И. Б. Манухина, Г. М. Савельевой.— М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.— 1088 с.
2. *Абашин В. Г., Шмидт А. А., Шелепов А. М., Пешков В. В.* Исследование стационарной гинекологической заболеваемости военнослужащих-женщин МО РФ // Вестн. Росс. Воен.-мед. акад.— 2013.— № 5 (45).— С. 46–50.
3. Охрана репродуктивного здоровья женщин-курсантов высших военных образовательных организаций МО РФ / Алиева М. Т., Шмидт А. А., Иванова Л. В., Игнатенко А. В., Васильчук И. М. // Матер. конф «История и перспективы отечественной гигиенической науки и практики».— СПб.: ВМедА, 2015.— С. 198.

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ РАДАХЛОРИНОМ И ФОТОДИТАЗИНОМ НЕ СОПРОВОЖДАЕТСЯ АПОПТОЗОМ ЛИМФОЦИТОВ В ЛИМФОУЗЛАХ

[1]*А. П. Дысин*, [1]*М. С. Рогачёва*, [1,3]*В. Ю. Кравцов*, [2]*М. А. Протченков*, [3]*Т. И. Кузьмина*, [2]*К. В. Павелец*

[1]Ленинградский государственный университет им. А. С. Пушкина, Санкт-Петербург, Россия

[2]Городская Мариинская больница, Санкт-Петербург, Россия

[3]Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург, г. Пушкин, Россия

artemdysin@mail.ru

Введение. В последнее время фотодинамическая терапия (ФДТ) с использованием фотосенсибилизаторов хлоринового ряда успешно применяется в онкологии. Вместе с тем, этот метод лечения может иметь негативные нетаргетные эффекты на стромальные и перитуморозные незлокачественные клетки [1], а также вызывать апоптоз лимфоцитов [2]. В связи с этим представляется практически важным изучить вопрос о возможных нетаргетных эффектах ФДТ на интактные лимфоциты лимфоузлов, находящихся в зоне облучения операционного поля пациентов, которым до операции вводился фотосенсибилизатор.

Цель работы: изучение апоптоза в лимфоцитах лимфоузлов после проведения ФДТ в ходе оперативного лечения рака поджелудочной железы, желудка и пищевода.

Испытуемые, материалы и методы. Проведено исследование маркеров апоптоза в клеточных популяциях лимфоцитов 25 лимфоузлов, полученных от 23 онкологических пациентов после сеансов ФДТ фотосенсибилизаторами хлоринового ряда: радахлорином (РХ) и фотодитазином (ФД). Перед операциями по поводу рака желудка, поджелудочной железы и пищевода пациентам вводили внутривенно РХ или ФД (за 2–2,5 ч до операции в дозировке 1,3–1,5 мг/кг). Во время операции один из лимфоузлов зоны абдоминальной лимфодиссекции предварительно до облучения разделялся пополам. Отделённая часть узла отпечатывалась на предметное стекло для цитологических исследований и сразу же помещалась во флакон с фосфатным буфером. Оставшаяся *in vivo* часть лимфоузла попадала в зону облучения установкой Фара-2 с экспозицией 20 мин во время проведения запланированного сеанса ФДТ. Затем облучённый материал через 30–90 мин удаляли и переносили в другой флакон с фосфатным буфером. Облучённый и необлучённый материал сохранялся при +37° С и в течение часа доставлялся в лабораторию. В лаборатории каждую половину лимфоузла препарировали таким образом, что злокачественные клетки отделяли от лимфоузла. Суспензии лимфоцитов в дальнейшем окрашивали с помощью Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Abcam, Великобритания) и исследовали методом про-

точной цитометрии (цитофлуориметр Beckman Coulter Navios™). Из оставшихся в суспензии клеток выделяли ДНК фенольным методом для определения апоптотической лестницы методом лэддеринга ДНК. Таким образом, индукцию апоптоза оценивали тремя методами: цитологическим, молекулярно-генетическим и с помощью проточной цитометрии. Все исследования проводили с информированного согласия каждого пациента на лечебную (диагностическую) манипуляцию (процедуру), которое он подписывал до операции, а сами исследования имели положительное решение этического комитета СПбГБУЗ «Городская Мариинская больница».

Результаты и их обсуждение. В результате проведённого эксперимента выявлено, что половины облучённых и необлучённых лимфоузлов не различались между собой по частоте встречаемости клеток с признаками апоптоза ($p<0,001$) и по показателю «окрашивание аннексином» ($p<0,05$). Доля лимфоцитов, окрашенных аннексином, составила 0,8% в необлучённых и 0,9% — в облучённых половинах лимфоузлов. Частоты встречаемости апоптотических телец не превышали 2‰ во всех исследованных цитологических препаратах (мазках-отпечатках облучённых и необлучённых половин лимфоузлов). После электрофореза образцов ДНК, выделенных из облучённых или необлучённых половин лимфоузлов, апоптотические лестницы на электрофореграммах ДНК не наблюдались ни водном случае.

Заключение. Таким образом, ФДТ РХ и ФД, проводимая в ходе оперативного лечения рака желудка, поджелудочной железы и пищевода, не сопровождается апоптозом лимфоцитов в лимфоузлах, попадающих в зону облучения.

Литература

1. *In vitro* photodynamic therapy with chlorin e6 leads to apoptosis of human vascular smooth muscle cells / Wawrzyńska M., Kałas W., Biały D., Zioło E., Arkowski J., Mazurek W., Strzadała L. // Arch Immunol Ther Exp (Warsz).— 2010.— Vol. 58 (1).— P. 67–75.
2. Heat shock proteins in the context of photodynamic therapy: autophagy, apoptosis and immunogenic cell death / Rodríguez M. E., Cogno I. S., Milla Sanabria L. S., Morán Y. S., Rivarola V. A. // Photochem Photobiol Sci.— 2016. [Epub ahead of print].

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСА ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОРСКИХ ЕЖЕЙ

[1,2]А. Е. Кательникова, [1]В. В. Воробьева, [2]К. Л. Крышень, [2]В. Г. Макаров, [1,2]А. Н. Шиков

[1]Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

[2]Санкт-Петербургский институт фармации, Ленинградская область, Россия

varuna1989@yandex.ru

К провоцирующим факторам, повышающим риск заболеваемости органов дыхания, относится курение. Уже после первого контакта с сигаретным дымом в бронхах возникает воспаление с характерными для него клеточной инфильтрацией лимфоцитами, нейтрофилами и макрофагами, содержащими пероксидазы. В мокроте курильщиков обычно повышена продукция цитокинов типа IL-1β, TNFα, IL-6 и также IL-8 с дальнейшим увеличением при обострении [1]. Не менее важный элемент патогенного воздействия сигаретного дыма — оксидативный стресс [2, 3]. Основными оксидантами табачного дыма являются O_2, O_3, OH, H_2O_2, NO, $HOCl_2$. Оксиданты оказывают прямое токсическое действие на ключевые структуры легких и бронхов: соединительную ткань, ДНК, липиды, протеины.

Цель работы. Оценка влияния комплекса гликозилированных полипептидов (КГП), выделенного из морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis*, на провоспалительные цитокины (IL-1β, TNFα, IL-6 и IL-8) и антиоксидантную систему на модели острого бронхита, индуцированного сигаретным дымом у крыс.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на крысах-самцах линии Wistar. Животные были разделены на 6 групп: 4 экспериментальных, контрольная и интактная. Животным экспериментальных групп распыляли ингаляционно раствор КГП в дозах 25, 50 и 100 мкг/кг, а также препарат сравнения Амброксол в дозе 3,6 мг/кг 1 раз в сутки, начиная с 14-го дня от начала индукции острого бронхита и в течение последующих 14 дней. Индукцию патологии осуществляли путем экспозиции сигаретным дымом с помощью специального оборудования. Для оценки эффективности исследуемых препаратов на 14-й и 28-й дни исследования у животных забирали кровь из хвостовой вены для определения содержания восстановленного глутатиона (GSH) и малонового диальдегида (MDA), а также на 28-й день исследования проводили анализ уровней IL-1β, TNFα, IL-6 и IL-8 в бронхоальвеолярном лаваже методом иммуноферментного анализа. Эвтаназию животных осуществляли методом цервикальной дислокации. Статистическую обработку проводили с использованием программы «Statistica 6.0» (Россия).

Результаты и их обсуждение. По результатам исследования КГП во всех исследуемых дозах статистически значимо снижал уровни провоспалительных цитокинов в бронхоальвеолярном лаваже животных по сравнению

Таблица

Уровни IL-1β, TNFα, IL-6 и IL-8 и содержание MDA и GSH, M±m

Группа	GSH (моль/мл), n=12		MDA плазмы крови (мкмоль/л), n=12		TNFα, пг/мл, n=6	IL-1β, пг/мл, n=6	IL-6, пг/мл, n=6	IL-8, пг/мл, n=6
	14 день	28 день	14 день	28 день				
Интактная	1,45±0,172	1,50±0,110*	4,0±0,44	4,6±0,41*	—	—	—	—
Контрольная	0,64±0,074#	1,09±0,116	8,8±0,78#	8,1±0,51#	326±13,7	1247±63,4	766±27,4	369±20,6
Амброксол, 3,6 мг/кг	0,66±0,097#	1,55±0,084*	8,3±1,15#	6,2±0,36	217±8,0*	837±15,6*	553±12,1*	251±6,1*
КГП, 25 мкг/кг	0,53±0,096#	1,63±0,079*	7,9±0,77#	7,3±0,72#	239±7,5*	902±24,6*	602±16,1*	254±5,8*
КГП, 50 мкг/кг	0,58±0,112#	1,67±0,078*	7,7±1,82#	6,1±1,20*	208±8,3*	853±17,6*	544±13,7*	245±7,2*
КГП, 100 мкг/кг	0,71±0,120#	1,62±0,057*	7,3±0,72#	5,5±0,66*	189±3,1*	808±14,1*	511±8,0*	228±8,7*

Примечания:
— различия статистически значимы по сравнению с животными интактной группы (p<0,05, ANOVA);
* — различия статистически значимы по сравнению с животными контрольной группы (p<0,05, ANOVA);
M±m — среднее ± стандартная ошибка среднего;
n — количество животных/проб.

с контрольной группой. Причем КГП в максимальной дозе снижал исследуемые уровни цитокинов в среднем на 37%, референтный препарат в дозе 3,6 мг/кг на 32% относительно показателей контрольной группы.

При анализе антиоксидантной системы выявлено, что во всех экспериментальных группах на 14-й день исследования оксидативный стресс проявился в статистически значимом увеличение маркера стресса малонового диальдегида в 1,8–2,2 раза и снижении восстановленного глутатиона в 2–2,7 раза. На 28-й день исследования в контрольной группе животных показатели изменились незначительно. В экспериментальных группах, наоборот, содержание GSH увеличилось и стало соизмеримо с показателями интактной группы. Причем содержание восстановленного глутатиона в крови животных, получавших КГП и Амброксол в исследуемых дозах, статистически значимо отличалось от данного показателя в контрольной группе (p<0,05, ANOVA).

Заключение. Таким образом, в контрольной группе животных в условиях длительной экспозиции сигаретным дымом процессы перекисного окисления превысили возможности антиоксидантной системы. На фоне применения КГП в дозах 50 и 100 мг/кг и референтного препарата достоверно снизился уровень MDA, что говорит о том, что система глутатиона полноценно справлялась с оксидативным стрессом, защищая мембраны клеток от окисления.

Проведенное исследование позволило установить, что КГП оказывает антиоксидантное действие и активно снижает уровни провоспалительных цитокинов.

Литература

1. *Yoshida T., Tuder R. M.* Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease // Physiological reviews.— 2007.— Т. 87, № 3.— С. 1047–1082.
2. *Клячкина И. Л.* Муколитик амброксол в программе лечения болезней органов дыхания // Справочник поликлинического врача.— 2007.— № 4.— С. 37–41.
3. *Rahman I., MacNee W.* Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases // Free Radical Biology and Medicine.— 1996.— Т. 21, №. 5.— С. 669–681.

ДЛИТЕЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ КРЫСАМ ПРОТАМИНА СУЛЬФАТА МЕНЯЕТ РЯД ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, НО НЕ ВЛИЯЕТ НА ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ГЛЮКОЗЕ И ИНСУЛЯРНУЮ ФУНКЦИЮ

А. А. Куликова, К. В. Деркач, А. П. Трашков, Н. А. Верлов, М. Р. Артеменко, А. О. Шпаков
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

kurricca@mail.ru

Введение. Протамин представляет собой положительно заряженный полипептид, который является антагонистом гепарина, образуя с ним ионный комплекс. Образование комплекса приводит к ингибированию активности гепарина и обусловливает специфическое противогеморрагическое действие протамина при кровоточивости. Среди побочных эффектов лекарственной формы протамина,— протамина сульфата (ПС), выделяют нарушения функций иммунной и сердечно-сосудистой систем. Недавно появилось сообщение, что длительное введение ПС животным вызывает у них диабетоподобное состояние [1]. Поскольку ПС широко используется в медицине, изучение его возможного диабетогенного эффекта является одной из актуальных задач, на решение которой и было направлено предпринятое нами исследование.

Цель исследования: изучение влияния хронического введения ПС на уровни глюкозы, инсулина и толерантность к глюкозе у крыс, а также изучение влияния ПС на ряд гематологических и биохимических показателей.

Объекты, материалы и методы. В экспериментах использовали самцов крыс Wistar (возраст 3 мес.). Животных разделяли на опытную группу («ПС»; n=12), крысы которой получали в течение 3 нед ПС (в/б, дважды в день, 30 мг/кг/сут), и группу контроля («К»; n=12), крысам которой вводили физиологический раствор. Измерение уровня глюкозы проводили в цельной крови, используя тест-полоски One Touch Ultra (США). Для оценки толерантности к глюкозе крысам в/б вводили раствор глюкозы (2 г/кг), концентрацию которой измеряли на протяжении 120 мин [2]. Для оценки чувствительности к инсулину использовали инсулиноглюкозотолерантный тест (ИГТТ), для чего крысам вводили глюкозу (2 г/кг) и инсулин (Хумалог; 0,8 МЕ/кг) [3]. Концентрацию инсулина измеряли с помощью набора Rat Insulin ELISA (Mercodia AB, Швеция). Статистический анализ данных проводили с помощью программы SPSS (IBM, США). Данные представляли в виде: «$M \pm SD$», считая различия между пробами достоверными при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. В группах «К» и «ПС» не было выявлено различий в уровнях глюкозы и инсулина, а также в концентрационных кривых для глюкозы и инсулина в ИГТТ. Эти позволило сделать вывод о том, что длительное введение ПС не вызывает изменений в уровне гликемии, не влияет на толерантность к глюкозе и активность инсулярного аппарата β-клеток. В ИГТТ было показано, что у крыс группы «ПС» не отмечается снижения утилизации глюкозы под действием инсулина. Более того, через 15 и 120 мин уровень глюкозы был достоверно ниже, чем в группе «К», что свидетельствует о небольшом повышении индуцированной инсулином утилизации глюкозы. Таким образом, трехнедельное введение ПС не приводило к снижению чувствительности тканей крыс к инсулину и не вызывало ослабления стимулированной инсулином утилизации глюкозы. Хроническое введение ПС повышало анизоцитоз тромбоцитов и их общее количество, хотя в последнем случае различия между группами «К» и «ПС» не были статистически значимыми. При этом, в группе «ПС» отсутствовали изменения показателей свертываемости крови, таких как уровни фибриногена и антитромбина, активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время. В группе «ПС» была повышена активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) на 34% и аспартатаминотрансферазы (АСТ) на 17%. Повышение активности АЛТ свидетельствует о нарушении функции печени, повышение активности АСТ, помимо этого, может указывать на нарушение функций миокарда. В пользу того, что введение крысам ПС вызывает нарушения в печени, свидетельствует также повышение на 83% концентрации общего билирубина. В группе «ПС» на 37% снижалась концентрация вазодилататора NO, в то время как уровень вазоконстриктора эндотелина-1 повышался на 22%, однако различия с группой «К» не были статистически значимыми. Наряду с этим, на 40% повышался уровень мозгового натрийуретического пептида (BNP; brain natriuretic peptide). Повышение уровня BNP является фактором прямого кардиотоксического действия хронического введения ПС крысам.

Заключение. Хроническое введение крысам ПС (30 мг/кг/сут) приводит к изменению ряда гематологических и биохимических показателей, таких как тромбоцитарный анизоцитоз, активность АЛТ и АСТ, соотношение факторов вазодилатации и вазоконстрикции. Эти изменения свидетельствуют о начальных стадиях синдрома полиорганной недостаточности с характерными для него нарушениями функций печени и сердечно-сосудистой системы. Хроническое введение крысам ПС заметно не влияет на уровень глюкозы и инсулина, толерантность к глюкозе и чувствительность тканей к инсулину, что указывает на отсутствие диабетогенного эффекта ПС.

Литература

1. *Воронкова Я. Г., Попова Т. Н., Агарков А. А., Зиновкин Р. А.* Влияние SKQ1 на активность глутатионовой системы и НАДФН-генерирующих ферментов в экспериментальной модели гипергликемии // Биохимия.— 2015.— Т. 80, № 12.— С. 1614–1621.

2. Влияние иммунизации крыс БСА-конъюгированным пептидом 269–280 меланокортинового рецептора 3-го типа на метаболические показатели и функции щитовидной железы / Деркач К. В., Шпакова Е. А., Жарова О. А., Бондарева В. М., Шпаков А. О. // Цитология.— 2014.— Т. 56, № 11.— С. 850–857.

3. The effect of long-term intranasal serotonin treatment on metabolic parameters and hormonal signaling in rats with high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes / Derkach K. V., Bondareva V. M., Chistyakova O. V., Berstein L. M., Shpakov A. O. // Int. J. Endocrinol.— 2015.— Vol. 2015.— Art. ID 245459.— 17 pp.

МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ IN VITRO НЕКОТОРЫМИ АНТИОКСИДАНТАМИ

А. Г. Мирошниченко, В. Ю. Перфильев
Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

ag.miro@ya.ru

Вопрос целесообразности использования антиоксидантов (АО) в условиях бактериальной инфекции остается открытым из-за их возможного влияния на активность антибактериальных средств (АБС). Бактерицидное действие многих АБС имеет общий механизм, связанный с генерацией ОН-радикалов и развитием окислительного стресса в бактериальных клетках [1].

Цель работы. Оценка изменения активности бактерицидных АБС в отношении условнопатогенных бактерий (на примере основных клинически значимых представителей семейства *Enterobacteriaceae* — *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*) *in vitro* под влиянием некоторых АО.

Материалы и методы. Для исследований in vitro были использованы периодические культуры контрольных штаммов наиболее значимых представителей семейства *Enterobacteriaceae* — *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Для инкубации готовили смесь на основе среды М9, в которую добавляли АБС до концентраций, составляющих 50% от минимальных подавляющих концентраций — гентамицин (AppliChem, Германия), ципрофлоксацин (Sigma-Aldrich, США), цефтазидим (Sigma-Aldrich, США). В опытные пробы дополнительно вводили АО до конечных концентраций 0,25, 0,5, 1, 2 и 4 (мМ) — восстановленный глутатион (Sigma-Aldrich, США), аскорбиновая кислота (Panreac, Испания), N-ацетилцистеин (Sigma-Aldrich, США), метилэтилпиридинол (ФГУП МЭЗ, Россия). Смеси инкубировали в воздушном термостате при 35° С в течение 24 часов с наблюдением за развитием культур с помощью аппарата Densi-la-meter (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Измерения проводили каждые 2 часа в течение 12 часов, а также через 24 часа инкубации. Данные сравнивали с данными контрольных инкубационных смесей, не содержащих АО. Для расчетов использовались программы MicrosoftOfficeExcel 2003 (MicrosoftCorporation, США) и SigmaStat 3.5 (SystatSoftwareInc., США) для Windows. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p \leqslant 0,05$ [2].

Таблица

Взаимодействие антибактериальных средств и антиоксидантов

Антибактериальное средство	*Escherichia coli*				*Klebsiella pneumoniae*			
	Глутатион	Аскорбиновая к-та	Метилэтилпиридинол	N-ацетилцистеин	Глутатион	Аскорбиновая к-та	Метилэтилпиридинол	N-ацетилцистеин
Гентамицин	А++	А++	А++	А++	А++	А++	А++	А++
Ципрофлоксацин	А++	0	С	А++	А+	0	С++	А
Цефтазидим	А++	С	С	А++	А++	С	С	А++

Примечание: А++ — антагонизм в течение 24 часов инкубации; А+ — антагонизм в большинстве наблюдений, зависимость от концентрации АО может отсутствовать; А — антагонизм, эпизодическое развитие культуры выше контроля, зависимость от концентрации АО может отсутствовать; 0 — отсутствие влияния, развитие культуры не изменяется, либо имеются точечные изменения относительно контроля; С — синергизм, эпизодическое развитие культуры ниже контроля, зависимость от концентрации АО может отсутствовать; С+ — синергизм в большинстве наблюдений, зависимость от концентрации АО может отсутствовать; С++ — синергизм в течение 24 часов инкубации.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования представлены в таблице.

Усиление процессов пероксидации ассоциировано с механизмом действия каждого из изучаемых АБС [1, 3, 4]. Установлено, что глутатион уменьшает активность цефтазидима, гентамицина, ципрофлоксацина, что может являться следствием использования бактерией глутатиона, являющегося естественным метаболитом-антиоксидантом микроорганизмов, извне. Аскорбиновая кислота обладает разнонаправленными эффектами в зависимости от АБС, что является следствием неустойчивости молекулы этого АО, а также ее способностью к автоокислению с образо-

ванием H_2O_2. Метилэтилпиридинол, самостоятельные бактерицидные свойства которого установлены нами ранее [5], проявил синергизм только при взаимодействии с цефтазидимом и ципрофлоксацином. N-Ацетилцистеин проявил схожий с глутатионом характер влияния, что является следствием схожего химического строения в части тиольной группы, обусловливающей АО-свойства.

Заключение. Наличие антиоксидантных свойств у соединения однозначно не определяет его влияние на развитие периодических бактериальных культур, а также их чувствительность к антибактериальным средствам. Взаимодействие АО и АБС имеет индивидуальный характер и должно оцениваться in vitro в каждом конкретном случае «АБС+АО+возбудитель».

Литература

1. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics / Kohanski M. A., Dwyer D. J., Hayete B., Lawrence C. A., Collins J. J. // Cell.— 2007.— Vol. 130.— P. 797–810.
2. *Лакин Г. Ф.* Биометрия.— М.: Высш. шк., 1990.— 352 с.
3. *Ayala-Castro C., Saini A., Outten F. W.* Fe-S cluster assembly pathways in bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev.— 2008.— Vol. 72.— P. 110–125.
4. *Pomposiello P. J., Demple B.* Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors // Trends Biotechnol.— 2001.— Vol. 19 (3).— P. 109–114.
5. *Мирошниченко А. Г., Перфильев В. Ю.* Антибактериальная активность метилэтилпиридинола // Мед. акад. журнал.— 2012.— Т. 12., (приложение).— С. 329–330.

ПРИМЕНЕНИЕ КЛОПРОСТЕНОЛА ПРИ ЗАДЕРЖАНИИ ЖЁЛТОГО ТЕЛА БЕРЕМЕННОСТИ В ПОСЛЕОТЕЛЬНЫЙ ПЕРИОД

Л. В. Набатова, Г. П. Косякова
Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

1chip2006@mail.ru

Жёлтое тело беременности — временная железа внутренней секреции в организме самки, образующаяся после овуляции и вырабатывающая гормон прогестерон. У нестельного животного происходит регресс жёлтого тела,— процесс, называемый лютеолизом. Лютеолитический каскад может быть представлен в следующем виде: окситоцин, вырабатываемый жёлтым телом, связывается с окситоциновыми рецепторами в эндометрии, стимулируя тем самым высвобождение простагландина из клеток эндометрия. Простагландин, высвобождаясь в маточный венозный кровоток, достигает яичника и вызывает регресс жёлтого тела [1]. Физиологическая роль простагландина в первый месяц после отёла заключается в стимулировании сокращения матки и поэтому вносит свой вклад в её инволюцию. Также он стимулирует выработку цитокинов, которые усиливают функцию фагоцитов и лимфоцитов [2]. Если простагландин вырабатывается в достаточном количестве, он может усилить защитный механизм, компенсируя иммуноподавляющее действие прогестерона. В 2015–2016 гг. в ОАО «Агрокомплекс им. В. М. Зайцева» удой коров айрширской породы увеличился на 3000кг молока, что способствовало сбою иммунной системы коров. За полтора года количество коров с нарушениями функции яичников увеличилось в 8 раз. Ростом заболевания обусловлена актуальность проведения настоящего исследования.

Цель исследования: оценить эффективность клопростенола для профилактики задержания желтого тела беременности.

Материалы и методы. Работа проведена на 37 коровах айрширской породы второй и выше лактаций в летний период, с суточным удоем от 32 кг молока в день, и предполагаемым удоем за лактацию 6200 кг. Коровы получали сбалансированное кормление, а также ежедневный выпас.

Перед началом эксперимента проведено ректальное исследование матки коров, которое показало наличие жёлтого тела у всех исследуемых коров и выявило 12 голов коров с задержанием последа. Поэтому животных условно разделили на две группы: группа 1 — здоровые коровы (25 голов) и группа 2 — коровы с патологией матки (12 голов). В группе 2 с первого дня эксперимента, одновременно с приемом клопростенола, проводили курс лечения: раствором Тилозинокара, Утеротоном, и жирорастворимыми витаминами. Исследование лимфоцитов крови животных проводили перед началом эксперимент и на 32-й день после отёла.

Эстрофан («Биовета», Чехия), синтетический функциональный аналог простагландина F2α, синтезируемого в яичниках коров, обладающий специфическим лютеолитическим действием, вводили внутримышечно в дозе 2 мл (содержит 500 мкг клопростенола) на голову, по основной схеме лечения [3]. Исследование матки проводили на протяжении всего опыта: на 21-й день от отёла и на 32-й день, а если корова не пришла в охоту и не была осеменена в течение 45 дней после отёла, животное исследовалось на 60-й и 90-й дни.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследований выявлено, что в группе 2 только у одной коровы лютеолиз жёлтого тела прошёл к 32-му дню, при исследовании наблюдался на яичнике фолликул I стадии. У остальных 11 коров на 32-й день развивалась в яичнике фолликулярная киста.

В группе 1 у 23 коров рассасывание жёлтого тела наступило до первого ректального исследования. На 21-й день было установлено наличие фолликула I или II стадии. Первый эструс наступил в интервале от 25-го до 35-го дня, что приближено к физиологическому лютеолизу.

Однако у двух коров при ректальном исследовании яичников на 21-й день было установлено задержание жёлтого тела беременности. Им повторно была введена внутримышечно доза препарата. При исследовании на 45-й день после отёла наличия жёлтого тела также не наблюдалось.

Наши исследования выявили, что лютеолиз жёлтого тела под действием эстрофана наступает у большинства здоровых животных при основной схеме лечения к 21-му дню после отёла. Но применение синтетического простагландина повлекло развитие иных патологий в организме животного: искусственно вызванный лютеолиз жёлтого тела и искусственно вызванная в дальнейшем течка повлекли за собой раннюю эмбриональную смертность и снижение оплодотворяемости 66% голов. Исследование крови, взятой на 32-й день после отёла, выявило наличие микроядер в одноядерных лимфоцитах у 9 голов, что говорит об ослаблении иммунной системы.

Заключение. Таким образом использование синтетических аналогов простагландина при патологиях матки (задержание последа, разные формы эндометрита) требует повышенного внимания. Применение клопростенола с целью профилактики задержания жёлтого тела возможно только после исследования матки и только клинически здоровым животным. Тогда эффективность профилактического метода составляет 92%.

Литература

1. Краткое руководство по репродукции животных. Крупный рогатый скот. пер. с англ., Ч. 1 и 2 / ред. М. Пташинская; пер. Н. Ю. Давыдова.— Минск: Позитив-центр.— 2012.— 177 с.
2. *Weems C. W., Weems Y. S., Randel R. D.* Prostaglandins and reproduction in female farm animals // Vet. J.— 2006.— Vol. 171 (2).— P. 206–228.
3. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России.— М.:АстраФармСервис, 2014.— 1600 с.

АКТИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В КРОВИ КРЫС НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УРАТНОЙ НЕФРОПАТИИ

В. Ю. Перфильев, А. Ю. Жариков, Д. Ю. Лукьяненко, И. В. Лысенко
Алтайский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Барнаул, Россия
1991PS@mail.ru

В развитых странах распространение уратного нефролитиаза значительно выросло. На долю мочекислых камней приходится 7–10% от общего числа почечных конкрементов [1]. Известно, что важной составляющей патогенеза оксалатного нефролитиаза является активация свободнорадикального окисления (СРО) [2], активность процессов СРО в условиях уратного нефролитиаза остается неизученной.

Цель работы: исследовать активность СРО в крови у крыс с экспериментальной уратной нефропатией.

Материалы и методы. Работа проведена на 32 крысах-самцах сток Вистар массой 250–330 г.

Для формирования уратной нефропатии использовали классическую модель ингибирования уриказы у крыс [3]. В качестве диеты контрольные животные (группа 1, n=14) ежедневно потребляли по 20 г стандартной лабораторной кормовой смеси. Подопытные крысы дополнительно получали по 0,145 г оксониевой кислоты (ОК) и 0,3 г мочевой кислоты (МК) в день и были разделены на 3 группы по 6 животных: группа 2 получала ОК и МК в течение 7 суток, группа 3 — в течение 14 суток, группа 4 — в течение 21 суток.

В конце каждой недели в суточной моче животных определяли содержание МК. После декапитации в крови крыс определяли концентрацию МК, активность каталазы (КАТ), глутатионпероксидазы (ГПО), супероксиддисмутазы (СОД), концентрацию восстановленного глутатиона (ВГ), тиобарбитурат-реактивных продуктов (ТБРП), общую антиоксидантную (ОАА) и общую прооксидантную активность (ОПА). Для сравнения данных использовали критерий Манна-Уитни (различия считали статистически значимыми при $p<0,05$).

Результаты и их обсуждение. Концентрация МК в плазме крови последовательно возрастала. К концу первой недели содержание урата в плазме было в 3,2 раза выше, чем в контроле. К окончанию эксперимента показатель превосходил контрольное значение уже в 5,2 раза. Экскреция МК также последовательно увеличивалась уже с окончания первой недели эксперимента и достигала максимума к 21 дню.

Как видно из таблицы, к окончанию первой недели основные показатели СРО существенно снижались. Это было наиболее характерно для показателей активности антиоксидантных ферментов СОД и ГПО, что закономерно обеспечивало снижение ОАА. Отмечалось также существенное снижение в эритроцитах уровня ВГ. Показатель ОПА, как и уровень ТБРП, существенно не изменялся. Известно, что более 50% антиоксидантной активности крови определяет МК [4]. Видимо, поэтому рост концентрации МК в плазме крови опытных крыс к концу первой недели обеспечивает значительное повышение антиоксидантной защиты, что, вероятно, не требует поддержания активности антиоксидантных ферментов на прежнем уровне.

К исходу 2–3 недель проявляется картина развившегося оксидативного стресса. В крови крыс параллельно увеличились значения ТБРП и ОПА. На этом фоне происходила активация ряда антиоксидантных ферментов и ОАА по сравнению с показателями первой недели. Вероятно, это обусловлено тем, что наряду с выраженными антиоксидантными свойствами МК может проявлять

Таблица

Показатели свободно-радикального окисления в крови крыс с экспериментальной уратной нефропатией

	ТБРП, мкМ/г	ОПА, %	ОАА, %	ВГ, ммоль/г	Антиоксидантные ферменты		
					Каталаза, %	СОД, %	ГПО, %
Контрольная группа	2,4 (0,7; 3,1)	34,6 (26,2; 44,4)	39,1 (36,2; 41,5)	0,4 (0,3; 0,5)	0,8 (0,7; 0,8)	5,0 (4,2; 6,6)	13,0 (10,7; 15,1)
1-я неделя	1,0 (0,9; 19,2) p=0,934	39,5 (31,6; 51,9) p=0,536	30,8 (26,3; 37,8) p=0,015	0,2 (0,2; 0,2) p=0,007	0,7 (0,6; 0,8) p=0,536	3,0 (1,5; 5,9) p=0,127	9,8 (9,0; 12,6) p=0,029
2-я неделя	2,5 (2,4; 2,6) p=0,873	73,3 (64,7; 81,8) p=0,068	42,4 (41,5; 43,3) p=0,177	0,4 (0,4; 0,4) p=0,578	0,7 (0,6; 0,8) p=0,937	2,6 (2,2; 3,0) p=0,032	14,9 (14,7; 15,1) p=0,302
3-я неделя	5,2 (4,9; 5,3) p<0,001	33,7 (28,8; 51,8) p=0,970	32,5 (32,2; 35,1) p=0,012	0,4 (0,3; 0,4) p= 0,794	0,7 (0,7; 0,7) p=0,433	6,8 (6,1; 11,0) p=0,023	13,3 (12,8; 13,6) p=0,794

Примечание. «р» — уровень статистической достоверности в сравнении с контрольной группой (критерий Манна-Уитни).

свойства прооксиданта. Данные свойства МК проявились в результате длительного введения, что подтверждается прогрессивным ростом концентрации ТБРП в крови за счет образования уратного радикала [5, 6].

Заключение. Совместное введение мочевой и оксониевой кислот крысам вызывает двунаправленное изменение СРО в крови. На первой неделе активность свободнорадикальных процессов ослабляется, что, по-видимому, обусловлено антиоксидантными свойствами растущей в плазме крови концентрации МК. К окончанию 2–3 недель экспериментальной патологии у крыс развивается оксидативный стресс, обеспечиваемый преобладанием прооксидантной активности МК.

Литература

1. *Барскова В. Г, Мукагова М. В.* Современные представления о патогенезе и методах коррекции уратного нефролитиаза у больных подагрой // Совр. ревматол.— 2011.— Т. 5, № 4.— С. 39–43.
2. О роли процесов свободно-радикального окисления в развитии экспериментального нефролитиаза / Зверев Я. Ф., Брюханов В. М., Талалаева О. С., Лампатов В. В., Жариков А. Ю., Талалаев С. В., Булгакова Я. С. // Нефрология.— 2008.— Т. 12, № 1.— С. 58–63.
3. *Stavric B., Johnson W. J., Grice H. C.* Uric acid nephropathy: an experimental model // Proc. Soc. Exp. Biol. Med.— 1969.— Vol. 130.— P. 512–516.
4. Parman M. S. Uric acid and cardiovascular risk // N. Engl. J. Med.— 2009.— Vol. 360.— P. 539.
5. Физико-химическая активность мочевой кислоты. Гиперурикемия — нарушение биологических функций эндоэкологии и адаптации, биологических реакций экскреции, воспаления и гидродинамического артериального давления / Титов В. Н., Дмитриев В. А., Гущина О. В. Ощепкова Е. В., Яшин А. Я. // Успехи совр. биол.— 2011.— Т. 131, № 5.— С. 483–502.
6. Glantzounis G. K., Tsimoyiannis E. C., Kappas A. M., Galaris D. A. Uric acid and oxidative stress // Curr. Pharm. Des.— 2005.— Vol. 32, № 11.— P. 4145–4151.

КЛИНИЧЕСКАЯ ПСИХОЛОГИЯ, СОЦИАЛЬНАЯ РАБОТА, ГУМАНИТАРНЫЕ ДИСЦИПЛИНЫ

ВЛИЯНИЕ ИРРАЦИОНАЛЬНЫХ УСТАНОВОК НА УРОВЕНЬ БАЛЛОВ ДЕПРЕССИИ ШКАЛЫ БЕКА У ПАЦИЕНТОВ С НЕЙРОПАТОЛОГИЕЙ

Э. А. Кадырова, Л. В. Селиванова, Н. М. Блинова
Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Уфа, Россия
kadirovaelvira23@rambler.ru

Введение. В работе представлены результаты теста А. Эллиса (на наличие иррациональных установок) и теста А. Бека (дисфункциональные отношения) пациентов отделения ранней нейрореабилитации Республиканской клинической больницы им. Куватова. В свете когнитивных подходов в основе депрессивных эмоциональных расстройств лежат когнитивные искажения — неадаптивные ошибки восприятия реальности [1, 2].

Материалы и методы. Было опрошено 30 пациентов, для исследования иррациональных установок использовался тест Эллиса, а для определения уровня депрессии — опросник Бека [3].

Средний возраст пациентов составил 43±2,76 года. Мужчины составили 53%, женщины — 47%. По результатам на уровень депрессии было выявлено: средний уровень депрессии по опроснику Бека в контрольной группе составил 8,9±1,72 баллов. Отсутствие депрессии — у 11 человек (48%), легкая депрессия у 6 человек (26%), умеренная депрессия у 1 человека (5%), выраженная депрессия — у 5 человек (21%), тяжелой депрессии не выявлено. Средний балл депрессии в исследуемой группе составил 12,63±1,31, что выше, чем в группе контроля (10,3+8,2 баллов) без статистической достоверности. При корреляционном анализе уровня депрессии по Беку со шкалами теста Эллиса была обнаружена значимая достоверная корреляция «Самооценки и рациональности мышления» с уровнем депрессии ($r=-0,36$, $p=0,049$). Связь отрицательная, что говорит о том, чем ниже уровень самооценки и рациональности мышления, тем выше уровень депрессии. В группе пациентов отделения ранней нейрореабилитации отмечен повышенный уровень депрессии относительно контрольной группы. Нами была выявлена зависимость уровня депрессии от уровня самооценки и рациональности мышления, что делает необходимым методы психологической коррекции как еще одной точкой приложения нейрореабилитации. Как один из вариантов коррекции иррациональных установок мышления пациентов — это применение когнитивно — поведенческой терапии, что позволит улучшить состояние пациентов.

Литература

1. *Бернс Д.* Хорошее самочувствие: Новая терапия настроений / Пер. с англ. Л. Славина.— М.: Вече, Персей, АСТ, 2009.— 400 с.
2. *Twomey C., O'Reilly G., Byrne M. et al.* A randomized controlled trial of the computerized CBT programme, MoodGYM, for public mental health service users waiting for interventions // British Journal of Clinical Psychology.— 2014.— Vol. 53 (4).— P. 433–450. doi:10.1111/bjc.12055.
3. *Захарова М. Л.* Особенности диагностики когнитивных искажений у больных неврозами // Современные подходы к диагностике и лечению нервных и психических заболеваний. Юбилейная научно-практическая конференция, посвященная 140-летию кафедры душевных и нервных болезней ВМА.— СПб, 2010.— С. 162.

ХРОНОМЕТРАЖНОЕ И ЭРГОНОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАБОТЫ ВРАЧА-ОСТЕОПАТА

Д. Е. Мохов, И. Г. Юшманов
Институт остеопатии Санкт-Петербурга, Россия
osteopathie@mail.ru

Специфика остеопатического приема сделала актуальным изучение распределения рабочего времени врача и соотношения временных затрат на основные элементы врачебной деятельности в ходе приема пациента [1, 2]. Были проведены хронометражные исследования по изучению затрат рабочего времени 5 врачей-остеопатов на амбулаторном приеме в течение 14 дней. Кроме изучения структуры затрат времени на выполнение различных видов работ и трудовых операций, определения фактической нагрузки врача на приеме, соотношения производительных и непроизводительных затрат рабочего времени, были изучены средние расходы времени на приеме пациентов, а также выявлены определенные резервы, использование которых будет способствовать оптимизации затрат рабочего времени, в частности увеличению фактических расходов времени на выполнение лечебно-диагностических мероприятий. При проведении хронометража заполнялась «Карта наблюдения работы врача-остеопата». Всего было заполнено 70 таких карт [3].

Результаты хронометража приема показали, что в среднем врач-остеопат принимает в час 1,2 больного в случае первичного и 1,6 — в случае повторного визита. Затраты на прием первичного пациента закономерно выше (в среднем — 50,7 мин.) по сравнению с повторным (37,8 мин.) за счет большего времени, уходящего на сбор анамнеза, физикальный осмотр и заполнение документации (в сумме эти элементы приема составляют соответственно 18,9 и 13,7 мин.). Наибольшая часть времени приема (51,5% для первичного и 73,5% для повторного визита пациента) уходит на собственно остеопатические манипуляции. По затрачиваемому времени эта часть приема практически одинакова в обоих случаях и очень близка для всех обследованных врачей (колебания между 25,1 и 30,2 мин.). Важно отметить, что как большие общие затраты времени на прием пациента, так и структура этих затрат не характерны для аллопатической медицины.

Проведенный хронометраж выявил также, что во время рабочего дня появляются временные не предусмотренные перерывы (отлучки врача из кабинета, посторонние разговоры, ожидание больного). Однако доля этих непроизводительных затрат времени невелика (не превышает 5%), так что в целом врачи-остеопаты работают с высокой эффективностью, возможно, даже чрезмерной. Ведь в связи с тем, что врач-остеопат выявляет нарушения микроподвижности тканей тела человека, ему требуется большая концентрация внимания. Поэтому после приема каждого пациента необходим перерыв на 5–10 минут.

В своей работе врач-остеопат использует краниальные (воздействие на краниосакральную систему), висцеральные (воздействие на внутренние органы) и структуральные (воздействие на костно-мышечную систему) приемы. Выполнение этих техник производится руками врача с максимальными точностью и вниманием, а так же с максимальной тактильной чувствительностью. Для работы остеопата характерна большая физическая нагрузка, сопровождающаяся статическим и динамическим напряжением позвоночника, а также верхних и нижних конечностей. Учитывая сложные анатомо-физиологические взаимоотношения различных отделов позвоночника с соответствующими группами мышц в разных рабочих позах во время работы, необходимо, принимая во внимание характер выполняемой работы, обеспечивать возможность свободного выбора позы, а также её произвольного изменения. Как правило, во время одной процедуры выполняются разнообразные мануальные приемы, поэтому у остеопатов имеет место равномерное распределение физической нагрузки в течение дня.

Как правило, работа осуществляется на столе с изменяющейся высотой. Его конструкция должна предусматривать возможность регулировки по высоте от 0,3 до 1 м от уровня пола и располагать выдвигающимся подголовником. Благодаря этому достигается определенное снижение энергозатрат врача-остеопата. При работе, требующей значительных усилий, высота рабочей поверхности стола может быть от 0,4 до 0,5 м, при выполнении более точных приемов — высота стола обычно от 0,5 до 0,7 м.

Наиболее ответственные, тонкие и точные работы выполняются на краниосакральной системе (манипуляции на голове и в области крестца) пациента, что осуществляется остеопатом в положении сидя «в изголовье» у пациента. Выполнение остеопатических техник на крестце производится врачом в положении сидя на уровне таза пациента, лицом к нему. При выполнении структуральных техник врач использует контакт своего тела с телом пациента, перенося свой центр тяжести так, чтобы добиться эффективной манипуляции в зоне воздействия. Этот процесс обеспечивается умелым использованием врачом массы своего тела, силы, нижних конечностей в качестве «посыла» движения и кистей рук — в качестве контроля точности выполнения приема. Выполнение висцеральных приемов производится в положении врача стоя, справа или слева от пациента, ориентируя свой центр тяжести над корригируемым органом.

Наиболее распространенными эргономическими недостатками в работе остеопата являются несоответствие высоты стола целям и задачам конкретной техники. Неумелое владение своим телом, избыточное количество техник, применяемых врачом-остеопатом в процессе одной процедуры, приводит к повышению энергозатрат врача и снижению эффективности лечения.

Литература

1. *Мохов Д. Е., Микиртичан Г. Л., Малков С. С.* Современные проблемы остеопатической медицины в России // Вестник Российской Военно-медицинской академии.— 2009.— №1 (25).— Ч. I.— С. 144–145.
2. *Чикуров Ю. В.* Остеопатическое лечение внутренних органов.— М., 2001.— 144 с.
3. Мануальная медицина, остеопатия: история, современное состояние, перспективы развития / Д. Е. Мохов, Г. Л. Микиртичан, А. З. Лихтшангоф, С. С. Малков.— СПб.: Сотис-Мед, 2011.— 220 с.

ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ, ОТЯГОЩАЮЩИЕ ТЕЧЕНИЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ ПРИ ОПИОИДНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

[1]*И. В. Савкин*, [1,2]*Е. В. Маркова*

[1]Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

[2]Новосибирский государственный педагогический университет, Россия

i.v.savkin@ngs.ru

Установлен ряд патогенетических механизмов модуляции активности иммунной системы при наркомании, причём наркотические вещества оказывают как прямое супрессивное влияние посредством связывания со специ-

фическими рецепторами на иммунокомпетентных клетках, так и опосредованное, через центральные механизмы [1]. Нарушение нейроиммунных взаимодействий, характерное для наркотической зависимости, является также существенным звеном патогенеза развития синдрома приобретенного иммунодефицита и может служить фактором, отягощающим течение ВИЧ-инфекции у наркозависимых.

Данная работа посвящена исследованию взаимосвязи между личностными особенностями и интегральными клинико-иммунологическими показателями течения ВИЧ-инфекции у потребителей инъекционных наркотиков (ПИН).

Методы. В качестве экспериментальной психодиагностической методики был использован МПВ (адаптированный тест Сонди) [2]. Линеаризация полученных данных осуществлялась путем перехода к общему числу выборов по каждому побуждению (сумма предпочтений и отвержений) и углу отклонения от нейтрального отношения Эго по каждому фактору, рассчитанному по формуле: $\varphi(побуждение)=arctg(побуждение+/побуждение-)-\pi/4$. Редукцию данных проводили методами факторного анализа и экспоненциальной регрессии.

В психологическом обследовании приняло участие 25 добровольцев, имеющих в анамнезе употребление инъекционных наркотиков, находившихся на плановой госпитализации в стационаре ГБУЗ НСО «Центр СПИД» в 2006–2008 гг., с диагнозом ВИЧ-инфекция (стадии III, IVA, IVB). Все обследованные пациенты регулярно, с момента постановки диагноза, получали противоретровирусную терапию в полном объёме в соответствии с общим протоколом (Методические рекомендации Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 29.12.06 г. № 7125-РХ. М., 2007). Данные клинического катамнеза пациентов за десять лет (2005–2015 гг.) были собраны и проанализированы. В качестве интегральных показателей течения заболевания использовали 10-летнюю выживаемость; временной декремент и предэкспоненту падения абсолютной концентрации CD4-лимфоцитов, полученные из экспоненциальной регрессии.

Результаты и обсуждение. Ранее нами была представлена характеристика психоэмоционального статуса ПИН, инфицированных ВИЧ [3]. Факторный анализ данных, полученных с использованием МПВ, выявил в указанной группе пациентов один многокомпонентный фактор, достоверно положительно ассоциированный с 10-летней выживаемостью и скоростью падения абсолютной концентрации CD4+ лимфоцитов. Компонентный состав фактора выражается формулой: $МПВфактор4=0,56\times\varphi(h)-0,35\times s+0,41\times\varphi(hy)-0,35\times k,-0,41\times\varphi(k)+0,79\times p+0,38\times m-0,35\times\varphi(m)$. Интерпретация формулы позволяет сказать, что тяжёлое течение ВИЧ-инфекции среди ПИН ассоциировано: с преобладанием черт противоположного пола в частности и недифференцированной сексуальности в целом (h+, s-, hy+); с повышенной экспансией эго, очевидно обусловленной первичной проекцией (сверхдавление p, безотносительно направления реакции); с повышенными ангедоническими тенденциями (m-); со слабым, эмоционально незрелым инфлятивно-проективным эго, в отсутствии жёсткого и оформленного Супер-Эго, характерными для дуальюниона (h+, s-, hy+, сверхдавление p). Полученные данные в полной мере подтверждают выдвинутую нами ранее гипотезу [3] об ассоциации незрелого экспансивного Эго, характерного для отношений жёсткого дуальюниона [2] на психическом уровне, со снижением иммунологической реактивности на физиологическом уровне. Одним из предполагаемых механизмов прогрессии ВИЧ, является протеинкиназа А-зависимая супрессия продукции цитокинов в мононуклеарах крови, вызванная повышенным уровнем продукции норадреналина [4]; что согласуется с полученными нами данными (норадреналиновый механизм отражён в показателях «s-», «m-» МПВ). Эти же показатели, согласно литературным данным, превалируют в группе мужчин-гомосексуалистов [4], у которых сравнительно сохранны механизмы действия катехоламиновой сигнальной системы. У ПИН (особенно группы опиоидов) катехоламиновые механизмы сигналинга существенно нарушены [1], при этом пути сигналинга, опосредованные стероидными половыми гормонами у ПИН остаются относительно сохранными. Имеется достаточный массив литературных данных, указывающий на протективную роль эстрогенов и андрогенов у женщин и мужчин (соответственно) при ВИЧ-инфекции [5]; что согласуется с выявленной факторным анализом в настоящем исследовании ведущей ролью показателя «h» МПВ у ПИН, инфицированных ВИЧ. Вышеизложенное позволяет считать механизм, опосредованный половыми гормонами, существенным звеном психонейроэндокринной иммунопротекции; и полагать, что тяжёлое течение ВИЧ-инфекции среди ПИН ассоциированно, в первую очередь, со сниженным уровнем половых гомонов и лишь во вторую — с повышенной продукцией норепинефрина.

Литература

1. *Чухрова М. Г., Дресвянников В. Л., Маркова Е. В.* Наркотическая зависимость: современные стратегии исследования / М. Г. Чухрова, В. Л. Дресвянников, Е. В. Маркова, Saint-Louis, Missouri, USA: Publishing House Sience and Innovation Center, 2015.— 218 с.
2. *Собчик Л. Н.* Метод портретных выборов-адоптированный тест Сонди. СПб.: Речь СПб, 2002.— 172 с.
3. *Савкин И. В., Пушкина Т. П.* Психодинамика дисбаланса иммунной системы. Экспериментальный психоанализ. Точки соприкосновения с медицинской иммунологией / И. В. Савкин, Т. П. Пушкина, Saarbrucken, Germany: LAP Lambert Academic Publishing, 2011.— 76 с.
4. *Cole S. W.* Psychosocial Influences on HIV-1 Disease Progression: Neural, Endocrine, and Virologic Mechanisms: // Psychosomatic Medicine.— 2008.— № 5 (70).— P. 562–568.
5. *Wojna V. et al.* Gonadal Hormone Dysfunction Modulates CSF Oxidative Stress Markers in HIV-Seropositive Women with Cognitive Impairment (S37. 002) // Neurology.— 2012.— № Meeting Abstracts 1 (78).— S37.002.

ВЛИЯНИЕ ИРРАЦИОНАЛЬНЫХ УСТАНОВОК НА УРОВЕНЬ БАЛЛОВ ТЕСТА ДЕПРЕССИИ БЕКА И УСПЕВАЕМОСТЬ СТУДЕНТОВ

Л. В. Селиванова, Э. А. Кадырова, Н. М. Блинова
Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Уфа, Россия
kadirovaelvira23@rambler.ru

Введение. Было исследовано влияние иррациональных установок на успеваемость и уровень депрессии у студентов. Из-за недостоверной информации часто формируются иррациональное установки у молодежи, что способствует неадаптивному восприятию реальности [1, 2].

Материалы и методы. Опрос проводился у 23 студентов стоматологического факультета 4 курса. Для исследования иррациональных установок использовался тест Эллиса и оценивали уровень депрессии по опроснику Бека [3, 4]. Средний возраст студентов составил 20,23±0,2 года. Юноши составили 26%, девушки — 74%. Средний балл по всем шкалам был в приделах среднего уровня иррациональных установок и средней вероятности развития стресса. Средний балл по успеваемости составил 4,04±0,18. Найдена достоверная корреляционная связь между средним баллом зачетной книжки и 2 шкалой по тесту Эллиса. Связь отрицательная, что означает, чем выше успеваемость, тем ниже баллы по тесту Эллиса. Средний бал депрессии по опроснику Бека в исследуемой группе составил 10,3±1,72. Что соответствует нижней границе легкой депрессии. Нами была найдена достоверная корреляционная связь между 3-й шкалой Эллиса и тестом Бека. Связь положительная, что может говорить о том, что чем меньше чрезмерно высоких требований к другим предъявляет студент, тем больше у него признаков депрессии. Нами не было выявлено достоверной корреляционной связи между тестом Бека и другими шкалами теста Эллиса. Наблюдалась тенденция к отрицательной зависимости остальных 4-х шкал от теста Бека.

Таким образом, отмечена средняя вероятность возникновения стресса и выявлена связь успеваемости с уровнем выраженности иррациональных установок по отношению к себе. Психо-образовательные методы могут повысить рациональность мышления студентов и служить средством профилактики депрессии в данной возрастной категории.

Литература

1. *Никифорова Г. С.* Диагностика здоровья. Психологический практикум / Под ред. проф. Г. С. Никифорова.— СПб.: Речь.— 2007.— 950 с.
2. *Пачганова С. С., Зуевская Т. В.* Современная наука: актуальные проблемы и пути их решения.— 2015.— № 9.— с. 22.
3. *Бернс Д.* Хорошее самочувствие: Новая терапия настроений / Пер. с англ. Л. Славина.— М.: Вече Персей, АСТ.— 2009.— 400 с.
4. *Calear A., Christensen H., Mackinnon A., Griffiths K.* Adherence to the MoodGYM program: Outcomes and predictors for an adolescent school-based population // Journal of Affective Disorders.— 2013.— Vol. 147 (1–3).— P. 338–344. doi:10.1016/j.jad.2012.11.036.

ПСИХОЛОГИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

[1]А. В. Смык, [1,2]Е. В. Маркова
[1]Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия
[2]Новосибирский государственный педагогический университет, Россия
anna-v-smyk@mail.ru

По данным ВОЗ, от 38 до 42% всех пациентов, посещающих кабинеты соматических врачей, относятся к группе психосоматических больных. Бронхиальная астма (БА) относится к классическим психосоматическим заболеваниям [1–3]. В патогенезе астмы большую роль играют факторы психологического порядка, что подтверждается, в частности, данными о возникновении и провоцировании приступов БА при эмоциональной нагрузке и психологическом стрессе [4]. Попытки выявить роль психических конфликтов в развитии БА, поиск предрасполагающих к её возникновению личностных особенностей, привели к гипотезе о существовании характерного для данного заболевания «профиля личности», предрасполагающего к манифестации БА [1–3]. Основные характеристики указанного профиля ассоциируются с проявлениями алекситимии, психологической характеристики личности, предполагающей сниженную способность в определении и вербализации собственных чувств [2]. Установлено, что выраженность алекситимии устойчиво положительно коррелирует с вероятностью возникновения и дальнейшего развития большинства психосоматических заболеваний. Считается, что не получившие своего словесного выражения интенсивные эмоции соматизируются и выражаются в симптомах болезни [2, 3]. Алекситимия рассматривается как патогенетический фактор, способствующий поддержанию болезни, в связи с чем ставится вопрос о психологическом воздействии на данные черты личности больного астмой.

У нас есть собственный позитивный опыт применения психокоррекционного воздействия в комплексной терапии БА. Нами была разработана и апробирована оригинальная программа телесно-ориентированной коррекции,

направленная на снижение степени выраженности алекситимии, обучение навыкам поведения (как в фазе обострения заболевания, так и в фазе ремиссии), обучение приёмам расслабления, аутогенной тренировки, формирование мотивации к самостоятельным занятиям [5].

В исследование были включены 141 пациент (62 мужчины и 79 женщин) сопоставимых по возрасту, вариантам БА и степени тяжести заболевания, проходивших курс стационарного лечения в Клинике иммунопатологии ФГБНУ «НИИФКИ» (г. Новосибирск). Показано снижение уровня алекситимии (согласно Торонтской алекситимической шкале) до нормативных показателей и достоверное улучшение функции внешнего дыхания (увеличение абсолютных и относительных показателей объёма форсированного выдоха за первую секунду) у пациентов, которым медикаментозная терапия была дополнена телесно-ориентированным воздействием, по сравнению с контрольной группой пациентов, где проводилась только медикаментозная терапия [6].

Проведенные нами наблюдения за состоянием пациентов в течение трех месяцев после выписки из стационара показали, что у пациентов, которым в процессе стационарного лечения был проведен курс телесно-ориентированной коррекции и, тем самым, снижен уровень алекситимии, реже наблюдались ночные приступы астмы, они реже пользовались ингалятором с быстродействующим лекарством, по сравнению с больными, которым указанное психокоррекционное воздействие не было проведено. При этом наиболее выраженный эффект зарегистрирован у пациентов мужского пола с доминантным левым полушарием головного мозга; у них же в последующие три месяца, согласно русскоязычной валидизированной версии теста «Asthma control test», был достигнут полный контроль над астмой [7].

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что телесно-ориентированное психокоррекционное воздействие играет существенную роль в лечении БА: повышает эффективность стандартных методов терапии, способствует более адекватному поведению больных вне стационара и улучшает качество их жизни. Вышеизложенное свидетельствуют о позитивном влиянии указанного психологического воздействия у больных БА на течение патологического процесса, что является обоснованием включения его в комплексную терапию данного заболевания и целесообразности дифференцированного подхода к терапии пациентов, страдающих БА, с учетом индивидуальных особенностей функционирования их нервной системы.

Литература

1. *Александер Ф.* Психосоматическая медицина.— М.: Институт общегуманитарных исследований, 2009.— 320 с.
2. *Малкина-Пых И. Г.* Психосоматика.— М.: Эксмо, 2009.— 1024 с.
3. *Сандомирский М. Е.* Психосоматика и телесная психотерапия: практическое руководство.— М.: Независимая фирма «Класс», 2005.— 592 с.
4. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / Под ред. Чучалина А. Г.— М.: Издательский дом «Атмосфера», 2007.— 104 с.
5. *Смык А. В.* Психофизиологические аспекты бронхиальной астмы: подходы к психокоррекции: монография / Смык А. В., Маркова Е. В., Вотчин И. С.; Мин-во образования и науки РФ, Новосиб. гос. пед. ун-т, НИИ клинической иммунологии СО РАМН.— Новосибирск: Изд-во НГПУ, 2013.— 86 с.
6. *Smyk A. V., Markova E. V., Rumina T. V., Votchin I. S.* The use of body-oriented psychotherapy for psychosomatic pathology // Applied and Fundamental Studies: Proceedings of the 3rd International Academic Conference, 2013.— P. 329–334.
7. *Смык А. В., Маркова Е. В., Вотчин И. С.* Новый перспективный подход к психологической коррекции алекситимии при бронхиальной астме // Мир науки, культуры, образования.— 2015.— № 1 (50).— С. 198–200.

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ НАУКИ — МЕДИЦИНЕ

ПРОВЕДЕНИЕ ТОЧНОЙ НОРМИРОВКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ПРИ РАБОТЕ С ИНДУЦИРОВАННЫМИ ПЛЮРИПОТЕНТНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ И ПОЛУЧЕННЫМИ ИЗ НИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ В НЕЙРАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ КЛЕТОЧНЫМИ ЛИНИЯМИ

А. С. Артюхов, Э. Б. Дашинимаев, В. Цветков, Е. А. Воротеляк
Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия
Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия

alexanderartyuhov@gmail.com

Введение. ПЦР в реальном времени является распространенным методом количественного определения уровня экспрессии генов. В настоящее время общепринятым является подход к нормировке результатов ПЦР в реальном времени, изложенный в 2002 г. в статье Vandesompele J. et al. [1]. Данный подход основан на вычислении нормировочных факторов (NF) с использованием сразу нескольких генов домашнего хозяйства. Для нормировки предлагалось выбрать несколько генов с наиболее стабильной экспрессией из 10 генов (ACTB, B2M, GAPDH, HMBS, HPRTI, RPLI3A, SDHA, TBP, UBC, YWHAZ). В данной статье был изложен и алгоритм для оценки стабильности экспрессии генов домашнего хозяйства, а так же алгоритм выбора достаточного количества генов для нормировки (обычно 3–4 гена). Тем не менее, для достижения оптимальной нормировки не всегда удается ограничиться работой только с этими десятью генами [2]. Таким образом, вопрос об оптимальной группе генов домашнего хозяйства, из которых можно выбрать гены для нормировки в каждом конкретном эксперименте, остается открытым. В 2013 г. в статье Eisenberg E., Levanon E. Y. были приведены результаты транскриптомного анализа, направленного на поиск генов домашнего хозяйства, и на отбор из найденных генов наиболее стабильно экспрессирующихся в различных типах клеток [3]. В итоге было выбрано 11 ранее не известных генов (C1orf43, CHMP2A, EMC7, GPI, PSMB2, PSMB4, RAB7A, REEP5, SNRPD3, VCP, VPS29).

В данной работе мы показали, что используя 9 генов из статьи [1] (ACTB, B2M, GAPD, HMBS, HPRTI, RPLI3A, SDHA, UBC, YWHAZ) и 7 генов из статьи [3] (C1orf43, EMC7, GPI, PSMB4, REEP5, SNRPD3, VCP) можно точно нормировать результаты ПЦР-анализа в реальном времени, для культур фибробластов, ПСК, нейральных стволовых клеток, а так же зрелых нейронов.

Результаты. В данной работе мы использовали следующие группы клеток: фибробласты (3 культуры), плюрипотентные стволовые клетки (ПСК), нейральные стволовые клетки (НСК) (7 культур), полученные из ИПСК, а так же зрелые нейроны (7 культур), полученные из нейральных стволовых клеток. Далее мы определили уровни экспрессии всех 16 генов домашнего хозяйства во всех рассматриваемых культурах клеток. Затем мы оценили стабильность их экспрессии. Результаты анализа представлены в таблице. Для каждого типа клеток мы провели отдельный анализ и выстроили исследуемые гены в порядке убывания стабильности экспрессии.

Таблица

Оценка стабильности экспрессии M.

Фибробласты		Плюрипотентные стволовые клетки		Нейральные предшественники		Нейрональные культуры		Все культуры	
HMBS	0,53	YWHAZ	0,65	REEP5	0,65	PSMB4	0,66	PSMB4	0,94
PSMB4	0,54	GAPDH	0,67	PSMB4	0,66	C1orf43	0,73	GAPDH	0,97
SDHA	0,54	C1orf43	0,77	HMBS	0,67	GAPDH	0,77	C1orf43	0,99
GAPDH	0,55	REEP5	0,79	YWHAZ	0,71	HPRTI	0,77	HMBS	1,02
RPLI3A	0,57	ACT	0,79	C1orf43	0,73	VCP	0,82	YWHAZ	1,04
EMC7	0,57	SNRPD3	0,82	SDHA	0,78	YWHAZ	0,83	REEP5	1,10

Гены ранжированы в порядке убывания стабильности экспрессии. Представлены шесть генов с наиболее стабильной экспрессией.

Получив информацию, о том какие гены обладают наиболее стабильной экспрессией, мы определили минимальный набор генов для каждой группы клеток, достаточный для точной нормировки результатов ПЦР в реальном времени (рис. 1).

Таким образом, для точной нормировки результатов ПЦР в реальном времени при работе с фибробластами следует использовать нормировочный фактор, рассчитанный по уровням экспрессии двух генов домашнего хозяйства (NF2), при работе с ПСК следует использовать NF4, при работе с НСК — NF2, при работе с нейронами — NF3, при работе с совокупностью всех культур — NF3.

Чтобы убедиться в достаточности указанного количества генов при вычислении нормировочных факторов NFi

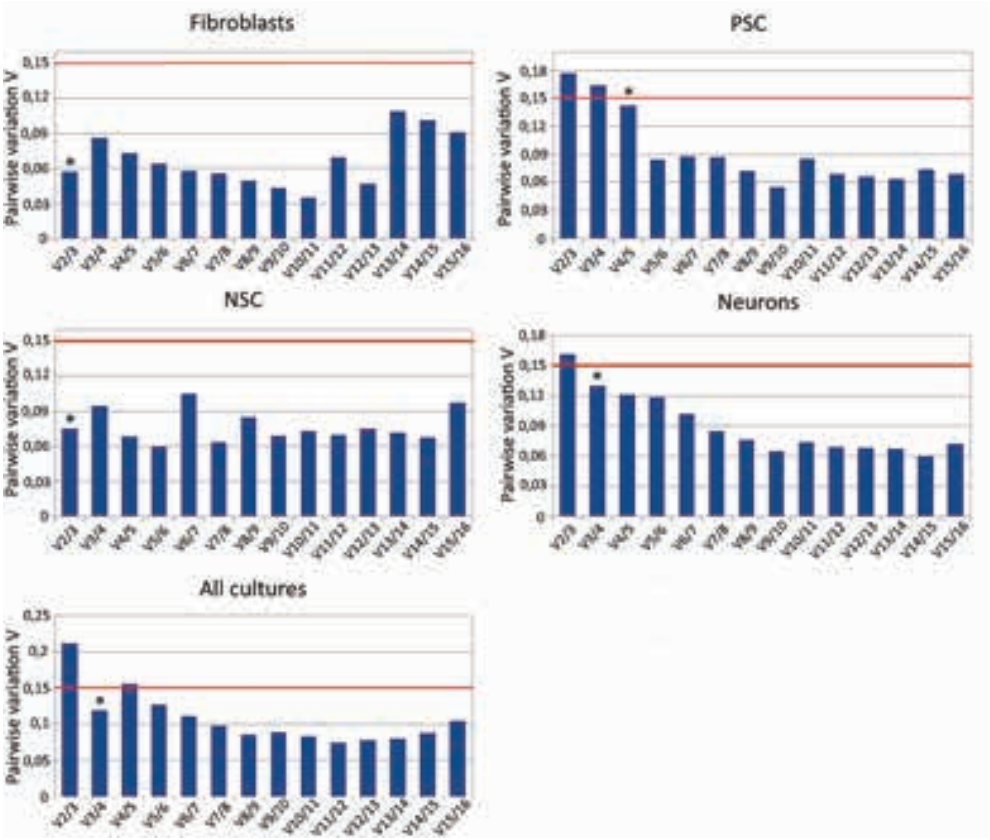


Рис. 1. Определение оптимального набора генов для нормализации результатов ПЦР в реальном времени. Представлены значения попарной вариации Vi/i+1 нормировочных факторов NFi и NFi+1. Звездочкой обозначено оптимальное количество генов для нормировки.

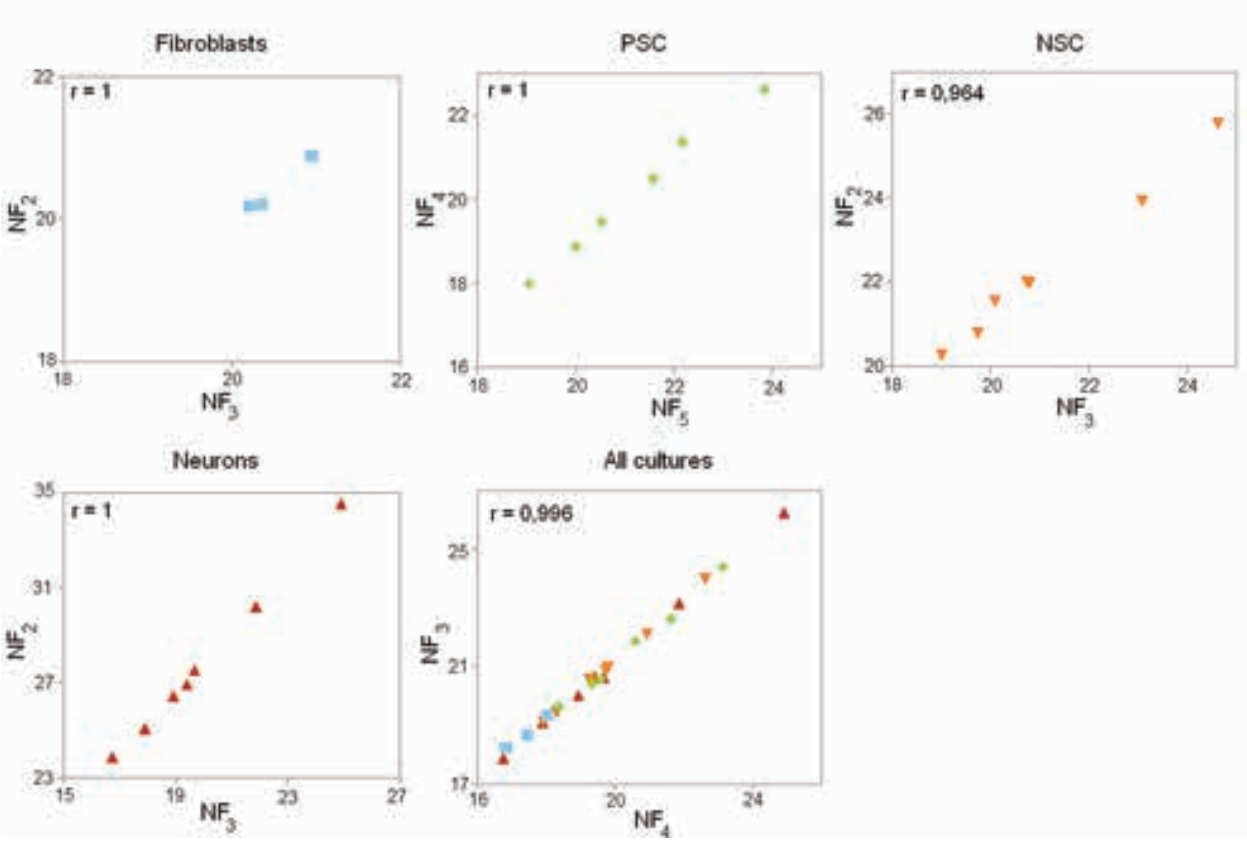


Рис. 2. Точечная диаграмма нормировочных факторов до и после добавления третьего гена для фибробластов, пятого для ПСК, третьего для НСК и четвертого для нейронов и всех культур. R — коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

мы построили точечные диаграммы и вычислили коэффициенты корреляции Спирмена между NFi и NFi+1. Полученные высокие значения коэффициентов корреляции говорят о том, что использование трех генов вместо двух для вычисления нормировочного фактора при работе с фибробластами избыточно. Аналогично избыточным является использование пятого гена при работе с ПСК, третьего при работе с НСК, четвертого при работе с нейронами и всеми культурами. Результаты представлены на рис. 2.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках соглашения о предоставлении субсидии №14.610.21.0001 (RFMEFI61014X0001)».

Литература

1. *Vandesompele J.* [и др.]. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. // Genome biology.— 2002.— Т. 3, № 7.
2. *Thellin O.* [и др.]. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits // Journal of Biotechnology.— 1999. № 2–3 (75). С. 291–295.
3. *Eisenberg E., Levanon E. Y.* Human housekeeping genes, revisited // Trends in Genetics.— 2013. № 10 (29). С. 569–574.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ ПРИ ЛЕЧЕНИИ СКАЛЬПИРОВАННЫХ РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

[1]М. С. Асадулаев, [1]Р. Г. Стояновский, [1]Е. В. Зиновьев, [1]И. А. Комиссаров, [2]Н. В.Смирнова, [1]М. Б. Панеях, [1]Б. А. Титов, [1]С. Д. Денисов, [1]А. В. Бердиков, [1]В. П. Карушев, [2]А. С. Шабунин, [2]П. В. Попрядухин, [1]Д. В. Костяков

[1]Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Россия

[2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия

marat.asadulaev@yandex.ru

Введение. Современные методы лечения обширных повреждений кожных покровов не являются совершенными и оставляют ряд нерешенных вопросов [1]. Лечение сопровождается массивной кровопотерей, а также высоким риском развития гнойных осложнений, выраженными косметическими дефектами в исходе заживления [2]. Уменьшение продолжительности лечения, профилактика осложнений и косметических дефектов являются наиболее актуально стоящими задачами [3]. Имеющиеся на Российском рынке раневые покрытия включают более двухсот различных образцов, при этом большинство из них зарубежного производства [4]. Нами была поставлена цель изучить влияние отечественных экспериментально разработанных в Институте высокомолекулярных соединений РАН (СПб) биополимерных покрытий на основе алифатического сополиамида и хитозана, а также покрытий на основе гидрогеля гиалуроновой кислоты, на процесс заживления скальпированной раны в эксперименте. Покрытия производятся в России, и их широкое внедрение способствует снижению экономических затрат на лечение, а также импортозамещению [5].

Материалы и методы исследования. Работа выполнена с участием 24 самцов крыс линии Wistar-Kyoto, массой 230–250 гр. Под общим обезболиванием проводили иссечение кожного лоскута площадью в 32 см^2, с подшиванием краев раны к подлежащим тканям. Животные были разделены на три группы (по 8 животных в каждой) в зависимости от применяемого метода лечения. Лечебные мероприятия у животных экспериментальных групп предусматривало аппликации в зону раневого дефекта раневых покрытий на основе алифатического сополиамида и хитозана (группа № 1), а так же покрытий на основе гидрогеля гиалуроновой кислоты (группа № 2). В контрольной группе лечение ран не проводилось. Эффективность лечебных мероприятий оценивали планиметрически по формуле Л. Поповой [6], а также при гистологическом (морфометрическом) исследовании биоптатов ран на 18 сутки. Полученные результаты обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют, что применение полимерных покрытий на основе алифатического сополиамида и хитозана, а так же гидрогеля гиалуроновой кислоты позволяют достоверно ускорить процесс регенерации раневого дефекта (таблица).

Данные таблицы позволяют заключить, что применение раневых покрытий на основе алифатического сополиамида и хитозана позволяло существенно оптимизировать процессы репаративной регенерации в зоне полнослойного дефекта кожи, при этом констатировано сокращение сроков отторжения струпа и заживления ран, соответственно, на 7,5 и 11,2 суток, по сравнению с контрольной группой. Использование покрытий на основе гидрогеля гиалуроновой кислоты также сопровождалось ускорение гистеогенеза в зоне полнослойных дефектов кожи, сокращением продолжительности периода их окончательного заживление. В этой группе экспериментальных животных процессы отторжения струпа завершались к 16,3 суткам, а процессы окончательного заживления ран — к 24,1 суткам. При гистологическом исследовании биоптатов ран

Таблица

Планиметрическая характеристика результатов эксперимента

Группы исследования	Средний срок периода (M±m), сутки		Количество микрососудов в поле зрения (увеличение 40х)	Клеточный состав (фибробласты\ нейтрофилы)
	отторжение струпа	заживление ран		
Хитозан-сополиамид	14,1±0,8[1]	19,2±0,6[1,2]	13±1,5[2]	+++\-
Гиалуроновая кислота	16,3±0,4[1]	24,1±0,2[1]	25±3	++\-
Без лечения	21,6±2,1	30,4±2,3	15±2	-\+++

[1] — достоверно (p<0,05) по сравнению с контролем; [2] — достоверно (p<0,05) по сравнению с экспериментальной группой № 2.

на 18-е сутки наблюдения наибольшее количество новообразованных сосудов микроциркуляторного русла (25 ед. в поле зрения) констатировано у животных второй группы, то есть на фоне применения покрытия гидрогеля гиалуроновой кислоты. Анализируемый показатель в группе животных, где использовались раневые покрытий на основе сополиамида и хитозана, соответствовал 13 ед. в поле зрения, т.е. оказался меньше на 48% (p<0,05).

Выводы. Полученные результаты исследований позволяют заключить, что применение полимерных покрытий на основе алифатического сополиамида и хитозана и гидрогеля гиалуроновой кислоты позволяет ускорить процесс регенерации полнослойного раневого дефекта кожи, что может сокращает продолжительность общего периода заживления механических повреждений кожных покровов. Покрытия на основе гиалуроновой кислоты более эффективно стимулируют рост микрососудов, что может ускорить развитие грануляционной ткани, подготовить кожный дефект к аутодермопластике.

Заключение. Предложенные биополимерные покрытия на основе алифатического сополиамида и хитозана, а также покрытия на основе гидрогеля гиалуроновой кислоты могут стать конкурентоспособной альтернативой аналогам зарубежного производства. Методика наложения раневых покрытий отличается технической простотой, что создаёт предпосылки для широкого внедрения предложенных раневых покрытий.

Авторы благодарят Российский научный фонд грант № 14-03-00003 за финансовую поддержку в проведении исследований.

Литература

1. *Юданова Т. Н., Решетов И. В.* Современные раневые покрытия: получение и свойства (обзор) // Химико-фармацевтический журнал.— 2006.— Т. 50, № 2.— С. 24–31.
2. *Щипицын С. И., Щирова В. Н., Тарасенко О. Н.* Обширная скальпированная рана височно-теменно-затылочной области головы у ребенка // Украинский нейрохирургический журнал.— 2007.— № 2.— С. 64–65.
3. Nanoparticle-mediated interplay of chitosan and melatonin for improved wound epithelialization / F. Blažević, T. Milekić, M. D. Romic et all. // Carbohydrate Polymers.— 2016.— Vol. 146.— P. 445–454.
4. *Фисталь Э. Я., Солошенко В. В.* Наш опыт клинического использования гидрофобных сетчатых покрытий // Медицина неотложных состояний.— 2009.— № 1 (20).
5. Современные раневые покрытия в местном лечении ран различного генеза / Д. В. Шаблин, С. Г. Павленко, А. А. Бондаренко и соавт. // Фундаметальные исследования.— 2013.— № 12 (2).— С. 361–365.
6. *Попова Л. Н.* Как измеряются границы вновь образующегося эпидермиса при заживлении ран: Автореф. дис. … канд. мед. наук.— Воронеж.— 1942.— 14 с.

N-АЦИЛДОФАМИНЫ ИНДУЦИРУЮТ АПОПТОЗ В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ PC12 ЧЕРЕЗ НЕКЛАССИЧЕСКИЙ КАННАБИНОИДНЫЙ РЕЦЕПТОР НЕ-CB_1-НЕ-CB_2

А. М. Ашба, М. Г. Акимов, Н. М. Грецкая, В. В. Безуглов

Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

alyafonya@mail.ru

Введение. N-ацилдофамины (NADA; N-acyl-dopamine) — биогенные конъюгаты дофамина с длинноцепочечными жирными кислотами. NADA проявляют свойства агонистов ванилоидного рецептора $TrpV_1$ и каннабиноидного рецептора CB_1, а также ряда других рецепторных белков [1]. NADA индуцируют гибель раковых клеток различного гистологического происхождения с полулетальными дозами в диапазоне 2–50 мкМ. Эта активность зависит от структуры остатка жирной кислоты и модификации дофамина [2], и, таким образом, является специфической. Тем не менее, молекулярная мишень NADA, обеспечивающая индукцию гибели клеток, до сих пор неизвестна.

Цель данной работы: определить вид клеточной смерти и идентифицировать рецептор NADA в клеточной линии феохромоцитомы PC12.

Материалы и методы. Линию клеток PC12 культивировали в условиях, рекомендованных ATCC (American type culture collection), с использованием 7,5%-й феталь-

ной бычьей сыворотки (ПанЭко, Россия). Клетки обрабатывали NADA в сочетании с различными блокаторами рецепторов в течение 18 ч, после чего жизнеспособность клеток и индукцию апоптоза оценивали с помощью МТТ-теста, анализа активности каспаз, анализа фрагментации ДНК и накопления ApoTRACE (Sigma-Aldrich, США). Для фармакологической блокады рецептора на плазмалемме клетки инкубировали с блокатором в течение 3 дней, промывали свежей средой и добавляли NADA на 1 ч, после чего заменяли среду свежей на 24 ч и оценивали жизнеспособность клеток.

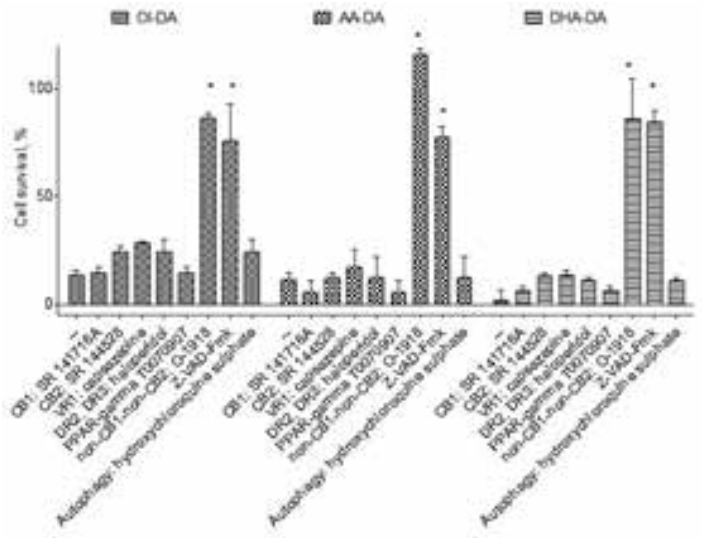


Рисунок. Влияние блокаторов рецепторов на цитотоксичность дофаминовых амидов арахидоновой (AA-DA), докозагексаеновой (DHA-DA) и олеиновой (OL-DA) кислот. Одновременное добавление: NADA, 3 мкМ; SR 141716A (CB_1), 0,5 мкМ; SR 144528 (CB_2), 0,5 мкМ; капсазепин ($TrpV_1$), 2 мкМ; галоперидол (D_2, D_3), 10 мкМ; T0070907 (PPAR-γ), 1 мкМ; Z-VAD-fmk, 50 мкМ; гидроксихлорохина сульфат, 10 мкМ; O-1918 (non-CB_1-non-CB_2), 3 мкМ. МТТ-тест, время инкубации 18 ч, среднее ± стандартное отклонение.

* — Статистически значимое отличие от NADA без блокаторов, $p<0,05$ (ANOVA с пост-тестом Тьюки).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что минимальное время инкубации с NADA, достаточное для индукции гибели клеток, составляло 1 ч. Предварительная обработка с ингибитором аутофагии гидроксихлорохином (Tocris, США) [3] не влияла на цитотоксичность NADA, в то время как панкаспазный ингибитор Z-VAD-Fmk (Tocris, США) предотвращал гибель клеток. Исходя из этого, сделано предположение о том, что NADA индуцируют апоптоз трансформированных клеток, что подтверждено с помощью анализа активности каспаз, набора ApoTRACE и анализа фрагментации ДНК. Наблюдаемая активация каспаз 3 и 9, вместе с полученными нами ранее данными о способности NADA вызывать накопление активных форма кислорода [4], указывает на запуск апоптоза через внутренний путь активации. Для идентификации рецептора NADA, отвечающего за индукцию апоптоза, клетки предварительно проинкубировали с набором блокаторов различных рецепторов (рис.). Единственным активным было вещество O-1918 (Sigma-Aldrich, США) — блокатор рецепторов группы не-CB_1-не-CB_2. Для дальнейшего подтверждения участия O-1918-чувствительного рецептора в цитотоксическом действии NADA применили метод фармакологической блокады под действием этого ингибитора. При этом цитотоксичность NADA существенно снизилась, что подтверждает участие рецептора, чувствительного к O-1918, в индукции апоптоза под действием NADA.

Заключение. Нами впервые показано, что NADA индуцируют апоптоз путем активации неклассического каннабиноидного не-CB_1-не-CB_2-рецептора. Следует отметить, что данное название относится к группе белков (GPR119, GPR55, GPR18) [5], и дифференциация наблюдаемых эффектов NADA между ними, а также дальнейшее изучение внутриклеточных путей передачи сигнала являются предметом последующих работ.

Работа была частично поддержана грантами Президента РФ МК-3842.2015.4 и РФФИ № 16-04-00729а.

Литература

1. *Akimov M. G, Bezuglov V. V.* N-Acylated dopamines: a new life for the old dopamine. In: Kudo E., Fujii Y., editors. Dopamine: Functions, Regulation and Health Effects.— N. Y.: Nova Science Publishers, 2012.— P. 49–80.
2. *Akimov M. G., Gretskaya N. M., Zinchenko G. N., Bezuglov V. V.* Cytotoxicity of endogenous lipids N-acyl dopamines and their possible metabolic derivatives for human cancer cell lines of different histological origin // Anticancer Res.— 2015.— Vol. 35, № 5.— P. 2657–2661.
3. *Lee H.-O., Mustafa A., Hudes G. R., Kruger W. D.* Hydroxychloroquine destabilizes phospho-s6 in human renal carcinoma cells // PLoS One.— 2015.— Vol. 10, № 7.— e0131464.
4. *Ashba A. M., Akimov M. G., Gretskaya N. M., Bezuglov V. V.* N-Acyl dopamines induce cell death in PC12 cell line via induction of nitric oxide generation and oxidative stress // Dok. Biochem. Biophys.— 2016.— Vol. 467, № 1.— P. 1–4.
5. *Abood M. E., Sorensen R. G., Stella N.* Endocannabinoids: actions at non-CB1.— N. Y.: Springer, 2013.

ВЛИЯНИЕ ТРЕХДНЕВНОГО ВВЕДЕНИЯ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА НА ЭКСПРЕССИЮ ФЕРМЕНТОВ СТЕРОИДОГЕНЕЗА И УРОВЕНЬ ТЕСТОСТЕРОНА У САМЦОВ КРЫС

А. А. Бахтюков, К. В. Деркач, А. О. Шпаков
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия
bahtyukov@gmail.com

Введение. Создание эффективных препаратов для активации рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР), контролирующего стероидогенез в семенниках и яичниках, является одной из важнейших задач современной эндокринологии. Длительное время для стимуляции ЛГР использовали лютеинизирующий гормон (ЛГ) и его функциональный аналог хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Однако их применение ограничено развитием к ним резистентности тканей, иммуногенностью, необходимостью парентерального введения. Этих недостатков лишены низкомолекулярные агонисты ЛГР, среди которых наибольший интерес представляют тиенопиримидиновые производные (ТП) [1]. Они, минуя эктодомен ЛГР, взаимодействуют с трансмембранным доменом рецептора и активируют его. В сравнении с гонадотропинами ТП быстрее деградируют, что предотвращает развитие к ним резистентности, но при этом не разрушаются и легко всасываются в желудочно-кишечном тракте, что делает их активными при пероральном введении [2]. Несмотря на прогресс, достигнутый в последние годы в изучении ТП, молекулярные механизмы их действия изучены недостаточно, отсутствуют данные об их влиянии на ферменты стероидогенеза.

Целью работы было провести сравнительное изучение влияния трехдневного введения ХГЧ и впервые синтезированного нами ТП 5-амино-*N-трет*-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил) тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамида самцам крыс на экспрессию ферментов стероидогенеза в семенниках и на уровень тестостерона (Т) в крови животных.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на половозрелых самцах крыс Wistar. Препараты вводили в течение трех дней в суточных дозах 25 мг/кг для ТП (в/б) и 100 МЕ для ХГЧ (п/к). Образцы тканей семенников и крови для анализа забирали через 3 ч после последнего введения препаратов. Для определения уровня Т использовали наборы Стероид-ИФА-Тестостерон (Алкор-Био, Россия). Для определения экспрессии генов ферментов стероидогенеза из гомогената семенников выделяли тотальную РНК (TRIzol® Reagent, США), проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США). Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью Applied Biosystems 7500 (США) с использованием SYBR Green Master Mix (Evrogen, Россия). Использовали праймеры, специфичные к генам, кодирующим ЛГР, белок StAR и цитохромы P450scc и P450c17 крысы. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics.

Результаты и их обсуждение. Трехдневное введение ХГЧ повышало уровень Т у крыс в 2 раза, в то время как обработка ТП повышала уровень гормона в 10 раз. У крыс, обработанных ХГЧ, экспрессия гена *LHR* практически полностью подавлялась, в то время как ТП влиял на нее сравнительно слабо (таблица). Это указывает на то, что введение крысам ХГЧ делает клетки Лейдига резистентными к действию гонадотропинов, в то время как при обработке животных ТП чувствительность семенников к активации агонистами ЛГР сохраняется. Основную роль в регуляции стероидогенеза играет белок StAR, который осуществляет перенос холестерина в митохондрии и является скорость-лимитирующим ферментом в синтезе Т. Ген *StAR* является мишенью для многих факторов, регулирующих стероидогенез в клетках Лейдига, в том числе для активированного лигандом ЛГР. Введение крысам ТП и ХГЧ повышало экспрессию гена *StAR* в семенниках на 116 и 473%, соответственно, из чего можно заключить, что при многократной обработ-

Таблица

Экспрессия генов, кодирующих ЛГР и ферменты стероидогенеза, в семенниках контрольных крыс и животных, в течение трех дней получавших ТП и ХГЧ (M±SD)

Ген	Контроль, n=4	ТП, n=4	ХГЧ, n=4
	Относительные единицы (RQ)		
LHR	1,00±0,26	0,74±0,28	0,03±0,001*
StAR	1,00±0,52	2,16±0,70*	5,73±1,16*
P450scc	1,00±0,22	0,75±0,31	4,96±1,06*
P450c17	1,00±0,30	0,78±0,33	0,44±0,14*

Уровень экспрессии генов нормирован по уровню экспрессии генов *Gapdh* и *Actb*. Значения RQ рассчитаны по отношению к контрольной группе крыс. * — различия между контрольной группой крыс и животными, обработанными ТП или ХГЧ, статистически значимы при P<0,05.

ке оба препарата, хотя и в различной степени, стимулируют активность этого ключевого фермента стероидогенеза. ТП лишь незначительно снижал экспрессию генов, кодирующих цитохромы P450scc и P450c17, в то время как ХГЧ влиял на них разнонаправлено — в пять раз повышал экспрессию гена для цитохрома P450scc и в два раза снижал экспрессию гена для P450c17 (таблица). Эти данные указывают на сходство стимулирующего влияния гонадотропина и ТП на экспрессию гена *StAR*, и на существенные различия их регуляторного влияния на экспрессию генов для цитохромов P450scc и P450c17.

Заключение. Таким образом, трехдневная обработка крыс ХГЧ вызывает резистентность клеток Лейдига к действию гонадотропинов, что приводит к ослаблению стимуляции ими стероидогенеза, несмотря на высокий уровень экспрессии таких стероидогенных ферментов, как Star и цитохром P450scc. В свою очередь, обработка ТП не снижает чувствительность семенников к эндогенным гонадотропинам, что, с учетом повышения экспрессии гена *StAR*, обеспечивает существенно более выраженную в сравнении с ХГЧ стимуляцию этим агонистом синтеза и секреции Т.

Работа поддержана РФФИ (проект № 16-04-00126).

Литература

1. A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor / van Koppen C. J., Zaman G. J., Timmers C. M., Kelder J., Mosselman S., van de Lagemaat R., Smit M. J., Hanssen R. G. // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.— 2008.— Vol. 378.— P. 503–514.
2. *Шпаков А. О., Деркач К. В., Дарьин Д. В., Лобанов П. С.* Активация аденилатциклазы тиенопиримидиновыми производными в семенниках и яичниках крыс // Цитология.— 2014.— Т. 56, № 5.— С. 346–352.

ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ И ФЕТАЛЬНЫЙ ГЕМОГЛОБИНЫ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ

Р. А. Бисалиева, Х-М. А. Магомедов

Астраханский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Россия

khadgim1392@mail.ru

Гипоксические поражения центральной нервной системы (ЦНС) плода и новорожденных являются одними из наиболее частых причин нарушений адаптации новорожденного в неонатальном периоде, высокой перинатальной и младенческой заболеваемости, задержки психомоторного развития детей. Частота выявления гипоксических повреждений у новорожденных достаточно широко варьирует, что обусловлено различными диагностическими подходами и возможностями. При этом не всегда удается получить исчерпывающую информацию, необходимую для качественной оценки степени тяжести поражения ЦНС. Правильный подход к решению этой проблемы предполагает своевременную и адекватную диагностику гипоксических состояний [1–3].

Одним из белков, участвующих в кислородном снабжении тканей кислородом, является гемоглобин (Hb). Известно, что Hb — это гетерогенная система, которая претерпевает изменения как в онтогенезе, отражая процесс созревания, так и при различных патологических состояниях. Гетерогенность Hb определяется цепями глобина (α, β, γ, ε), которые при различных сочетаниях между собой определяют тип гемоглобина: эмбриональный (HbP) — $\alpha 2\varepsilon 2$, $\varepsilon 4$; фетальный (HbF) — $\alpha 2\gamma 2$; взрослый (HbA) — $\alpha 2\beta 2$ [4].

Одним из свойств HbP и HbF является повышенное сродство к кислороду, что позволяет в условиях относительной внутриутробной гипоксии обеспечивать достаточное снабжение тканей плода кислородом. По данным исследований, одним из проявлений гипоксии является увеличение в крови больных концентрации фетального гемоглобина (HbF), логичным видится вовлечение в процесс активации при гипоксии не только гена HbF, но и HbP [5–7].

Объектом исследования были 44 образца венозной крови новорожденных с гипоксически-ишемическим и гипоксически-геморрагическим поражением ЦНС. В зависимости от степени тяжести все новорожденные с гипоксически-геморрагическим поражением ЦНС были разделены на 3 группы: внутрижелудочковое кровоизлияние (ВЖК) I степени; ВЖК II степени; ВЖК III–IV степени. Иммунохимический анализ проводили с помощью самостоятельно полученных моновалентных тест-систем на HbP и HbF. Выявление HbP осуществляли иммунодиффузией по Оухтерлони, содержание HbF определяли радиальной иммунодиффузией по Манчини.

Полученные данные свидетельствуют о двукратном повышении HbP при гипоксически-геморрагическом поражении ЦНС, причем самая высокая концентрация 15 мг/л была обнаружена при внутрижелудочковом кровоизлиянии III — IV степени. При исследовании уровня HbF в крови новорожденных детей с различными формами гипоксического поражения ЦНС выявлена наиболее высокая концентрация при гипоксически-ишемическом поражении ЦНС — 476,2±18,4 мг/л, что в 1,47 раза превышает продукцию фетального гемоглобина при гипоксически-геморрагическом поражении (таблица).

Таким образом, результаты работы дают основание для более глубокого изучения и могут стать основой для разработки дифференциально-диагностического критерия тяжести гипоксического поражения ЦНС.

Таблица

Уровни HbP и HbF у новорожденных с различными формами гипоксического поражения ЦНС

	Средние концентрации HbP в крови новорожденных		Средние концентрации HbF в крови новорожденных	
	n	мг/л	n	мг/л
Гипоксически-ишемическое поражение ЦНС	25	5,0±1,4	25	476,2±18,4
Гипоксически-геморрагическое поражение ЦНС	19	9,32±1,1	19	324,0±30,2
— ВЖК I степени	5	5,4±1,8	—	—
— ВЖК II степени	12	10,0±0,4	—	—
— ВЖК Ш-1У степени	2	15,0±1,9	—	—
Всего:	**44**		**44**	—

Литература

1. *Ветчинкина Ю. В., Скоромец А. П.* Поиск биомаркеров церебральной гипоксии у новорожденных // Известия Коми научного центра УрО РАН.— 2013.— Вып. 1 (13).— С. 56–62.
2. *Ветчинкина Ю. В., Скоромец А. П., Ветчинкин А. В.* Клиническая значимость антител к нейроспецифическим антигенам у новорожденных, родившихся в асфиксии // Современные проблемы науки и образования.— 2013.— № 2.
3. Маркеры повреждения нейронов и астроцитов в плазме крови новорожденных при церебральной ишемии разной степени тяжести / Демьянова И. М., Таранушенко Т. Е., Салмина А. Б., Окунева О. С., Моргун А. В., Малиновская Н. А., Тагаева Г. А., Шароглазова Л. А., Крицкая И. А. // Сибирское медицинское обозрение.— 2008.— № 2 (50).— С. 27–31.
4. *Топунов А. Ф., Петрова Н. Э.* Гемоглобины: эволюция, распространение и гетерогенность // Успехи биологической химии.— 2001.— Т. 41.— С. 199–228.
5. Фетальный гемоглобин как тест для диагностики гипоксических состояний / Никулина Д. М., Дьякова О. Н., Кривенцев Ю. А., Корноухова И. Ю., Агапова А. Б. // Тезисы научных докладов «III съезд биохимического общества».— СПб., 2002.— С. 131.
6. Фетальный и эмбриональный типы гемоглобина в крови новорожденных с внутриутробной гипоксией / Никулина Д. М., Кривенцев Ю. А., Бахмутова Л. А., Бисалиева Р. А., Лапеко С. В., Штепо М. В., Огуль Л. А. // Астраханский медицинский журнал.— 2007.— Т. 2, № 2.— С. 132–133.
7. *Никулина Д. М., Кривенцев Ю. А., Бисалиева Р. А., Лапеко С. В.* Новый иммунохимический тест для лабораторной оценки состояния эритрона // Клин. лабор. диагностика — 2009.— № 12.— С. 27–30.

ПРОТЕАЗЫ *PURPUREOCILLUM LILACINUM K1* С APC-ПОДОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ

А. А. Бобровская, А. А. Осмоловский, А. В. Кураков

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия

tamanshii@gmail.com

Введение. Сердечнососудистые заболевания и способы их лечения являются одной из центральных проблем биомедицинских исследований. Многие заболевания такого рода возникают по причине нарушений в каскадной системе протеаз, контролирующей вязкость крови — системе гемостаза. Лечение в таких случаях подразумевает заместительную терапию, однако используемые ферменты зачастую дороги или недостаточно специфичны [1], потому актуален поиск новых источников подобных протеаз.

Материалы и методы. Перспективной заменой могут быть внеклеточные протеазы микромицетов, специфически активирующие ферменты системы гемостаза [2]. Показано, что наиболее перспективными источниками протеаз, обладающих тромболитическим действием, могут выступать микромицеты, ассоциированные с беспозвоночными [3]. Был проведен скрининг таких микромицетов, в ходе которого была отобрана культура *Purpureocillum lilacinum k1*, секретирующая протеазы способные расщеплять хромогенный пептидный субстрат (ХПС) активированного протеина С (проявлять APC-подобную активность) [4]. В рамках данной работы исследования были сфокусированы на оптимизации условий культивирования микромицета.

Первые двое суток культуру выращивали на среде с суслом и пептоном, после чего по 3% биомассы переносили в колбы со средами различных составов (см. табл.). На 13-е сутки в полученной культуральной жидкости проверяли активности с ХПС активированного протеина С (pyroGly-Pro-Arg-pNA), тканевого активатора плазминогена (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA) и тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA).

Результаты и их обсуждение. В таблице представлены результаты эксперимента.

Наибольшая активность была показана на среде № 4 с 1% гидролизата рыбной муки. Достаточно высока была

Таблица

Влияние состава среды на продукцию протеаз, расщепляющих ХПС ферментов системы гемостаза человека

	№ среды	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Состав среды, %	Глюкоза	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Глицерин	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	ГРМ	0,5	—	0,5	1	—	0,5	—	—	0,5	—	0,5	1	0,5	—
	Пептон	—	—	—	—	—	—	0,5	—	0,5	0,5	0,5	1	0,5	—
	$NaNO_3$	0,2	0,2	—	—	0,4	—	—	0,2	0,2	0,2		—	0,5	—
	$NH_4H_2PO_4$	—	—	—	—	—	0,2	0,2	0,2	—	—	—	—	—	0,4
	$MgSO_4$	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Активности с ХПС, Е*мл$^{-3}$	АРС	8,236	7,242	25,205	39,476	14,626	0	0	33,583	4,26	20,164	17,04	7,526	9,94	4,118
	Тканевого активатора плазминогена	9,23	5,822	41,961	16,969	10,366	0	13,277	17,04	18,46	29,039	15,336	16,756	14,2	1,704
	Тромбина	4,26	2,485	22,01	11,005	5,822	0	7,668	18,957	11,36	6,958	14,2	23,714	24,14	9,372

активность и при использовании сочетания двух различных форм неорганического азота в среде № 8. Тем не менее, наиболее оптимальным стоит считать все же использование ГРМ как основного и единственного источника азота в силу более простого и экономичного состава среды. К тому же, исследуемые так же побочные активности с ХПС тромбина и тканевого активатора плазминогена при повышении концентрации ГРМ снизились, что выгодно отличает данный источник азота в качестве фактора, позволяющего добиться чуть большей селективности при получении целевого фермента.

Выводы. На основании полученных результатов может быть разработан микробиологический способ получения протеаз с АРС-подобной активностью для заместительной терапии при лечении заболеваний системы гемостаза человека.

Литература

1. Craik C. S., Page M. J., Madison E. L. Proteases as therapeutics // Biochem. J.— 2011.— Vol. 435. P. 1–16.
2. Воздействие внеклеточных протеаз микромицетов рода Aspergillus на белки системы гемостаза человека / Осмоловский А. А., Звонарева Е. С., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Егоров Н. С. // Биоорганическая химия.— 2014.— Т. 40, № 6.— С. 688–694.
3. Энтомопатогенные микромицеты — перспективные продуценты протеиназ с фибринолитической активностью / Шаркова Т. С., Матвеева Э. О., Кураков А. В., Осмоловский А. А., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Егоров Н. С. // Усп. Мед. Микол.— 2015.— Т. 14.— С. 458–461.
4. Протеиназы микромицетов с активностями ферментов системы гемостаза человека / Бобровская А. А., Осмоловский А. А., Звонарева Е. С., Крейер В. Г., Кураков А. В. // Усп. Мед. Микол.— 2015.— Т. 14.— с. 414–416.

ГИПОКСИЯ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АРОА-1, АВСА1 И С3 В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА

А. М. Богомолова, В. С. Шаваа, А. А. Никитин
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

alabakelia@gmail.com

Атеросклероз — хроническое воспалительное заболевание, характеризующееся образованием бляшек в интиме артериальных сосудов. Важную роль в патогенезе атеросклероза играют макрофаги, испытывающие постоянную гипоксию в микроокружении бляшки [1]. Одной из центральных гипотез регрессии атеросклероза рассматривается обратный транспорт холестерина. Ключевые участники этого процесса — АТФ-связывающий кассетный транспортер А1 (АВСА1), присутствующий на поверхности всех клеток организма, и аполипопротеин А1 (АроА-1), синтез которого происходит в печени и тонком кишечнике. Недавно в нашей лаборатории была показана экспрессия эндогенного АроА-1 в макрофагах [2]. Если АроА-1 и АВСА1 проявляют атеропротектерные функции, роль компонента комплемента С3 в атерогенезе спорна [3]. Локальными продуцентами С3 в атеросклеротической бляшке являются макрофаги.

Целью данной работы явилось изучение механизмов регуляции экспрессии генов АроА-1, АВСА1 и С3 в THP-1 макрофагах человека при индукции клеточного ответа на гипоксию $CoCl_2$.

С помощью ПЦР в реальном времени было установлено повышение уровня мРНК генов АроА-1, АВСА1 и С3, а также увеличение уровня внутриклеточного и поверхностного белка АроА-1 при инкубации THP-1 макрофагов с $CoCl_2$.

Известно, что в сигналинг, запускаемый в макрофагах при гипоксическом окружении, вовлечены стресс-активируемые МАР киназы Erk1/2, p38 и JNK [4], а также фактор транскрипции NF-κB [5]. Для выявления роли МАР киназ и NF-κB в $CoCl_2$-зависимой экспрессии генов АВСА1 и С3 использовались специфические ингибиторы p38 (SB203580), JNK1/2/3 (SP600125), MEK1/2 (U0126) и NF-κB (QNZ). В качестве положительного контроля применялся агонист LXRs (TO901317), приводящий к значительному повышению уровня мРНК АВСА1 в макрофагах. Ингибиторы MEK1/2 и JNK1/2/3, но не p38 отменили $CoCl_2$-зависимую активацию экспрессии АВСА1 и С3. Ингибитор NF-κB, помимо отмены действия $CoCl_2$, снизил активность обоих генов в необработанных $CoCl_2$ клетках. Агонист LXRs, как и ожидалось, сильно повысил уровень мРНК АВСА1 самостоятельно и совместно с $CoCl_2$, но привел к противоположному эффекту в отношении экспрессии С3.Таким образом, сигнальные каскады MKK4/7-JNK1/2/3 и MEK1/2-Erk1/2, но не MKK3/6-p38, а также фактор транскрипции NF-κB участвуют в $CoCl_2$-зависимом повышении экспрессии АВСА1 и С3 в макрофагах.

В итоге можно рассмотреть механизм положительной регуляции экспрессии генов АроА-1, АВСА1 и С3 в макрофагах при индукции ответа на гипоксию (рис.). Повышенный уровень мРНК и, по-видимому, белка С3 ведет к продукции анафилатоксина С3а. Связываясь

с рецептором С3а на поверхности макрофагов, С3а индуцирует повышение экспрессии С3 и усиленный захват мЛПНП [5]. Хотя эндогенный АроА-1 стабилизирует АВСА1 и проявляет антивоспалительные свойства, его содержание не коррелирует с уровнем обратного транспорта холестерина [2]. Более того, полученные в нашей лаборатории данные указывают на участие АроА-1 и АВСА1 в захвате мЛПНП макрофагами. С другой стороны, известно, что доставка вектора экспрессии АроА-1 человека в макрофаги мышей-нокаутов по АроА-1 приводит к значительному уменьшению бляшек [6]. Таким образом, если индукцию экспрессии С3 при гипоксии можно рассматривать как атерогенный фактор, роль повышения уровня мРНК АроА-1 и АВСА1 остается спорной.

Литература

1. *Fong G.-H.* Potential contributions of intimal and plaque hypoxia to atherosclerosis // CurrAtheroscler Rep.— 2015.— Vol. 17, № 6.— p. 510.
2. Endogenous apolipoprotein A-I stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and modulates Toll-like receptor 4 signaling in human macrophages / Mogilenko D. A., Orlov S. V., Trulioff A. S., Ivanov A. V., Nagumanov V. K., Kudriavtsev I. V., Shavva V. S., Tanyanskiy D. A., Perevozchikov A. P. // FASEB J.— 2012.— Vol. 26, № 5.— P. 2019–2030.
3. Complement in atherosclerosis: friend or foe? / Speidl W. S., Kastl S. P., Huber K., Wojta J. //J. Thromb. Haemost.— 2011.— Vol. 9, № 3.— P. 428–440.
4. Inactivation of Tristetraprolin in Chronic Hypoxia Provokes the Expression of Cathepsin B / Fuhrmann D. C., Tausendschön M., Wittig I., Steger M., Ding M. G., Schmid T., Dehne N., Brüne B. // Mol Cell Biol.— 2015.— Vol. 35, № 3.— P. 619–630.
5. Modified Low Density Lipoprotein Stimulates Complement C3 Expression and Secretion via Liver X Receptor and Toll-like Receptor 4 Activation in Human Macrophages / Mogilenko D. A., Kudriavtsev I. V., Trulioff A. S., Shavva V. S., Dizhe E. B., Missyul B. V., Zhakhov A. V., Ischenko A. M., Perevozchikov A. P., Orlov S. V. // J. Biol. Chem.– 2012.— Vol. 287, № 8.— P. 5954–5968.

6. Retrovirus-mediated Expression of Apolipoprotein A-I in the Macrophage Protects against Atherosclerosis *in Vivo* / Ishiguro H., Yoshida H., Major A. S., Zhu T., Babaev V. R., Linton M. F., Fazio S. //J. Biol. Chem.— 2001.— Vol. 276, № 39.— P. 36742–36748.

УКОРОЧЕНИЕ ТЕЛОМЕР И ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК АПОПТОТИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ ENDOG ПРИВОДЯТ К ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ CD4+ Т КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Д. А. Васина, Д. Д. Жданов, В. С. Орлова, Н. Н. Соколов
Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва, Россия
Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

darvasina@rambler.ru

Теломераза является мультиферментативным комплексом, который синтезирует теломерные повторы TTAGGG на 3`-концах хромосом человека. Злокачественные опухолевые клетки, нормальные стволовые клетки и активированные лимфоциты обладают теломеразной активностью, что позволяет им поддерживать повышенный репликативный потенциал [1]. Ингибирование теломеразы в нормальных клетках вызывает укорочение теломер до критических значений, переход клеток в состояние репликативного старения и апоптоз [2]. Однако в единичных клетках укорочение теломер вызывает хромосомные мутации, что приводит к их злокачественной трансформации [3]. Ранее мы показали, что сверхэкспрессия апоптотической эндонуклеазы EndoG вызывает альтернативный сплайсинг каталитической субъединицы теломеразы hTERT (human Telmerase Reverse Transcriptase) и ингибирует ее активность. Кроме того, EndoG вызывает повреждение ДНК по полиG-полиC последовательностям [4]. Целью работы явилось изучение влияния сверхэкспрессии EndoG на активность теломерзы в нормальных, не опухолевых клетках, способности EndoG вызывать повреждения в клетках ДНК, а так же проследить дальнейшую судьбу клеток. CD4+ Т клетки человека трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. ОТ-ПЦР в реальном времени и метод Вестерн блоттинга применяли для изучения экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT. Оценку активности теломеразы проводили методом TRAP (Telomeric Repeats Amplification Protocol). Методом проточной цитометрии проводили исследование иммунофенотипических характеристик клеток. Метод TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), адаптированный для проточной цитометрии применяли для анализа уровня повреждения ДНК клеток. Сверхэкспрессия EndoG в CD4+ Т клетках человека вызывала увеличение экспрессии сплайс-варианта hTERT и уменьшение экспрессии полноразмерного активного варианта. Изменение пропорции сплайс-вариантов hTERT в клетках приводило к понижению активности теломеразы. Сверхэкспрессия EndoG вызывала повреждения ДНК в большинстве клеток. Дальнейшее культивирование таких клеток приводило к резкому укорочению длины теломер до критических значений и переходу клеток в состояние репликативного старения. Репликативное старение сопровождалось увеличением экспрессии и активности бета-галактозидазы. Данные клетки были не способны к дальнейшему делению. Наблюдалось ингибирование клеточного цикла, все клетки находились в G0/G1 фазе. При дальнейшем культивировании происходила массированная гибель клеток по пути апоптоза после 24–28 удвоений популяции. Однако, некоторые клетки, трансфицированные геном EndoG, оставались живыми, но не способные к делению. Исследование иммунофенотипа показало, что через 48–61 день культивирования происходила их трансформация, приводящая к развитию фенотипических характеристик Т клеточного лимфобластного лейкоза. Трансформированные CD4+ Т клетки обладали значительно более высокой активностью теломеразы и пролиферативной активностью, чем исходные CD4+ Т клетки. В контрольных клетках, трансфицированных pGFP, не происходило изменения экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT, а также ингибирования активности теломеразы. Количество клеток с повреждениями ДНК не увеличивалось. Клетки продолжали делиться, гибли по пути апоптоза и не подвергались злокачественной трансформации. Таким образом, нами показано, что сверхэкспрессия EndoG способна вызывать ингибирование активности теломеразы, что наряду с повреждение ДНК приводит к злокачественной трансформации нормальных CD4+ Т клетках человека в условиях *in vitro*.

Литература

1. *Kaszubowska L.* Telomere shortening and ageing of the immune system.59 // J Physiol Pharmacol.— 2008.— Suppl 9.— P. 169–86.
2. *Harley C. B., Futcher A. B., Greider C. W.* Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts // Nature.— 1990.— 31;345(6274).— P. 458–60.
3. *Shay J. W, Wright W. E.* Role of telomeres and telomerase in cancer.— 2011.— 21(6).— P. 349–53.
4. *Yin X., Apostolov E. O., Shah S. V., Wang X., Bogdanov K. V., Buzder T., Stewart A. G., Basnakian A. G.* Induction of renal endonuclease G by cisplatin is reduced in DNase I-deficient mice.— 2007.— 18(9).— P. 2544–53.

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ УЧАСТНИКОВ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА, ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА И ТРАНСФЕРРИНА, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА HBA1C

И. В. Войнова, В. А. Костевич, А. Ю. Власенко, А. В. Соколов, В. Б. Васильев
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
iravoynova@mail.ru

Введение. Сахарный диабет второго типа (СД2) — метаболическое заболевание для которого характерна хроническая гипергликемия, к биохимическим проявлениям которой относят увеличение уровня гликированного гемоглобина (HbA1c). Хроническая гипергликемия сопровождается развитием так называемого «карбонильного стресса», разновидности окислительного стресса, опосредованного карбонильными продуктами неферментативного окисления глюкозы, например метилглиоксалем [1]. Окислительному стрессу противостоят антиоксиданты, среди которых важную роль играют медь- и железосодержащие белки плазмы крови: церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ), соответственно. И ЦП, и ТФ, являются важными участниками метаболизма железа, первый — за счет ферроксидазной активности, а второй — за счет железо-транспортной. Связь степени развития СД2 и изменения функций ЦП и ТФ довольно мало изучена в литературе. Хотя развитие таких осложнений СД2, как трофические язвы, напрямую связаны с изменением оттока железа и эффективно лечатся хелаторами железа [2].

Целью нашей работы было сравнение показателей метаболизма железа у условно здоровых доноров и пациентов с различной степенью компенсации СД2.

Материалы и методы исследования. С помощью традиционных биохимических методов проводили измерение в лизатах эритроцитов уровня HbA1c (HPLC), а в сыворотке крови концентраций и активности ЦП, концентрации ТФ и меди, общей железосвязывающей активности (ОЖСС). Образцы крови были получены от пациентов диабетического центра Санкт-Петербурга. Показатели разделили на три группы по уровню HbA1c: I группа — 4,5–5,8% (условно здоровые доноры, 110 человек), II группа — 5,90–6,91% (доноры с компенсированным СД2, 194 человека) и III группа — 6,93–14,11% (доноры с некомпенсированным СД2, 60 человек). Проводили дисперсионный анализ измеренных биохимических показателей. Для проверки гипотезы, что анализируемая выборка имеет нормальное распределение, использовали критерий Колмогорова–Смирнова.

Результаты и их обсуждение. Несмотря на достоверные различия уровня HbA1c ($p<0,05$) между тремя сформированными группами, не было обнаружено достоверных различий концентраций ЦП, ТФ, меди, ферроксидазной и пара-фенилендиамин-оксидазной активности ЦП и ОЖСС между группами. Однако расчетные показатели, характеризующие удельную активность ТФ (отношение ОЖСС и концентрации трансферрина) и удельную активность ЦП (отношение активного и иммунореактивного ЦП), были достоверно ($p<0,05$) снижены в группах II и III по сравнению с группой I. Отношение концентрации меди и иммунореактивного ЦП достоверно отличалось ($p<0,05$) только в группах I и III.

На основании сравнения полученных данных можно сделать вывод о том, что степень компенсации гипергликемии при СД2, которую принято оценивать по уровню HbA1c, качественно совпадает с изменением удельной активности ТФ и ЦП. Достоверные отличия удельной активности ТФ и ЦП, а также отношения концентрации меди и ЦП у пациентов III группы могут свидетельствовать об их неспособности компенсировать действие карбонильного стресса и гликирования белков, вызванного гипергликемией. Полученные результаты находятся в соответствии с данными об эффективности применения хелаторов железа с целью компенсации трофических язв, осложняющих СД2.

Литература

1. Механизмы окислительной модификации липопротеинов низкой плотности при окислительном и карбонильном стрессах / Ланкин В. З., Тихазе А. К., Капелько В. И., Шепелькова Г. С., Шумаев К. Б., Панасенко О. М., Коновалова Г. Г., Беленков Ю. Н. // Биохимия.— 2007.— Т. 72, № 10.— С. 1330–1341.
2. Beneficial effects of desferrioxamine on encapsulated human islets — *in vitro* and *in vivo* study / Vaithilingam V., Oberholzer J., Guillemin G. J., Tuch B. E. // Am. J. Transplant.— 2010.— Vol. 10.— P. 1961–1969.

СТРУКТУРА ПОСЛЕДСТВИЙ СОЧЕТАННЫХ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВЫХ ТРАВМ И ОСОБЕННОСТИ РОДОРАЗРЕШЕНИЯ

[1,2]А. А. Волынкин, [1,2]П. Н. Власов, [2]В. А. Петрухин
[1]Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова, Россия
[2]Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии, Россия
insomnia_2010@mail.ru

Ежегодно в России около 1,2 миллиона человек получают черепно-мозговую травму (ЧМТ). Особенностью травм в современном техногенном веке является преобладание сочетанных повреждений [1], которые вносят

значимый вклад в статистику летальности (до 75–80%) молодого населения от травм [2]. Рост числа сочетанных травм коррелирует с увеличением дорожно-транспортных происшествий (ДТП) и производственного травматизма [3]. Помимо острой ЧМТ широко распространены и последствия ЧМТ [4].

Сочетание последствий изолированных или сочетанных ЧМТ с акушерской патологией приводят к сложностям при ведении беременности и выборе метода родоразрешения, что представляет актуальность данной проблемы.

Цель исследования. Изучить структуру сочетанных ЧМТ (СЧМТ) в отдалённом периоде травмы у беременных и оценить их влияние на тактику родоразрешения.

Материалы и методы. Клинико-анамнестическое обследование 47 беременных с последствиями ЧМТ, проходивших родоразрешение в акушерском физиологическом отделении ГБУЗ МО «МОНИИАГ» (с 2013 по 2015 г.).

Методы статистической обработки (описательные и непараметрический критерий Манна-Уитни), где различия достоверными при значениях $p<0,05$.

Результаты исследования. Все обследуемые беременные были разделены на 2 группы: 1 — с последствиями сотрясения головного мозга (21; 44,7%); 2 — с последствиями ушиба головного мозга (26; 55,3%). Средний возраст в 1 группе составил 31,4±6,3 года, а во 2 — 31,9±6,3.

Проанализированы все предоставленные медицинские данные (выписки, амбулаторные карты, результаты медицинских обследований, проведённых ранее) и установлено, что: закрытая ЧМТ наблюдалась в 40 (85,2%) случаях, открытая — в 7 (14,9%), СЧМТ в 15 (32%), изолированная в 32 (68%).

В 1 группе этиологическим механизмом ЧМТ были: ДТП у 7 (33,3%) пациенток, криминальные травмы — у 5 (23,8%), спортивные — у 5 (23,8%), бытовые — у 2 (9,5%) и падения — у 2 (9,5%). СЧМТ была диагностирована у 3 (14,3%) пациенток, изолированная у 18 (85,7%); повторные закрытые ЧМТ у 6 (28,6%). СЧМТ в 1 группе были представлены в виде: ЧМТ и скелетная — у 2 (9,5%); ЧМТ и абдоминальная, скелетная — у 1 (4,8%). СЧМТ в 1 группе были следствием: ДТП — 1 (4,8%); спортивной травмы — 1 (4,8%); падения — 1 (4,8%).

Во 2 группе причины ЧМТ были следующие: ДТП (15; 57,8%), криминальные травмы (5; 19,3%), падения (4; 15,4%) и комбинированный механизм (3; 11,6%). Изолированная ЧМТ выявлена — у 14 (53,9%), а СЧМТ у 12 (46,2%). Структура СЧМТ во 2 группе была представлена в виде: ЧМТ и скелетная — у 5 (19,3%); ЧМТ и абдоминальная, скелетная — у 4 (15,4%); ЧМТ и абдоминальная, торакальная, скелетная — у 2 (7,7%); ЧМТ и торакальная, скелетная травма — у 1 (3,9%). Механизм повреждения при СЧМТ: ДТП (6; 23,1%); криминальный (2; 7,7%); падения (2; 7,7%) и комбинированный (2; 7,7%).

В 1 группе родоразрешение через естественные родовые пути выполнено у 17 (81%) беременных, из них с ограничением потуг в 1 (4,8%) случае по офтальмологическим показаниям (миопия).

Кесарево сечение (КС) (4; 19%) выполнено по акушерским (3; 14,4% рубец на матке после ранее проведенного КС (3; 14,2%), миома матки (1; 4,8%)) и сочетанием акушерских и офтальмологических показаний (рубцовые изменения на матке после ранее проведенного КС и миопия высокой степени 1; 4,8%).

Во 2 группе родоразрешение через естественные родовые пути выполнено у 20 (77%), из них с вакуум-экстракцией плода у 8 (30,8%): по акушерским показаниям (слабость родовой деятельности — 3; 11,6%), 4; 15,4%); неврологическим (посттравматические кистозно-глиозные изменения головного мозга, как последствия тяжелого УГМ и проведения трепанации — 2; 7,7%) посттравматические кистозно-глиозные изменения — 3; 11,6%); офтальмологическим (миопия — 3; 11,6%) и их сочетанием. В 1 случае (3,9%) по акушерским показаниям (слабость родовой деятельности) родоразрешение закончено наложением акушерских щипцов. КС 7 (27%) выполнено по показаниям: акушерским (рубцы на матке 3; 11,6%; острая гипоксия плода — 1; 3,9%); неврологическим (последствия ЧМТ с развитием синдрома ВЧГ — 1; 3,9%); травматологическим (СЧМТ с повреждением костей тазового кольца — 3; 11,6%); офтальмологическим (2; 7,7%: последствия ЧМТ с посттравматической атрофией диска зрительного нерва — 1 (3,9%); с витриохореоретинальной дистрофией 1 (3,9%)). В 4-х (15,4%) случаях имелось сочетание показаний к КС.

Выводы. В результате исследования выявлено, что распространенность последствий изолированной ЧМТ превалируют над сочетанными. Последствия СЧМТ в подавляющем количестве (n=12; 46,2%; $p=0,021$) представлены в после тяжелых ЧМТ. Метод родоразрешения в 34,1% случаев (n=16) определяется акушерскими показаниями, в 14,9% (n=7) другими последствиями сочетанной ЧМТ (травматологическими, офтальмологическими) и лишь в 6,4% (n=3) — по неврологическими показаниям.

Список литературы:

1. *Гуманенко Е. К.* Политравма. Актуальные проблемы и новые технологии в лечении // Тез. докл.международной конф. «Новые технологии в военно-полевой хирургии и хирургии мирного времени».— СПб.— 2006.— С. 4–14.
2. *Григорян Г. А.* Пути снижения летальности при сочетанной черепно-мозговой травме: Автореф. дис. … канд. мед. наук.— СПб., 2008.— 20 с.
3. *Куршакова И. В.* Сочетанная механическая травма. Неврологические осложнения травматической болезни.— 2008.
4. *Лихтерман Л. Б.* Черепно-мозговая травма. Диагностика и лечение.— М.: Гэотар-Медиа, 2014.— 488 с.

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА, ПРЕДПОЛАГАЕМЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ КИСТ СПИННОГО МОЗГА

[1]А. Д. Воронова, [2]О. В. Степанова, [2]А. В. Чадин, [3]Г. К. Бирюкова, [3]И. В. Решетов, [1,2]В. П. Чехонин

[1]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия

[2]Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В. П. Сербского, Москва, Россия

[3]Университетская клиническая больница № 1 Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова, Россия

nastyanastyav@mail.ru

Введение. Существующие хирургические и медикаментозные методы лечения посттравматических кист спинного мозга часто оказываются малоэффективными. В качестве перспективного направления для восстановления утраченной нервной ткани рассматривается клеточная терапия. Обонятельная выстилка (ОВ) человека является потенциальным источником аутологичных клеток для клеточной терапии посттравматических повреждений спинного мозга [1]. Накоплено большое количество экспериментальных данных об использовании этих клеток для терапии травм спинного мозга как в острой, так и в хронической фазах [2]. Однако практически нет данных об использовании клеток ОВ для лечения посттравматических кист спинного мозга. Для клеточной терапии наиболее перспективными считаются нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК) обонятельного эпителия, поскольку они способны дифференцироваться в зрелые нейроны [3], а также обкладочные клетки (ОК) из собственной пластинки эпителия ОВ, поскольку они создают микроокружение для нейронов, способствуют росту аксонов и ремиелинизации нервных волокон [4]. Для применения этих клеток в клеточной терапии необходимо разработать оптимальный, хорошо воспроизводимый протокол.

Цель исследования: разработать оптимальный протокол для получения клеток ОВ человека, предполагаемых для использования в клеточной терапии посттравматических кист спинного мозга.

Испытуемые, материалы и методы. В исследовании были использованы образцы ОВ, полученные из верхних и нижних носовых ходов у 13 пациентов при плановом хирургическом вмешательстве в Отделении пластической хирургии УКБ № 1. Все пациенты дали своё согласие на участие в данной научной работе. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Площадь образцов ОВ составляла 5–25 мм^2 (суммарно). Нами были оптимизированы методы получения первичной культуры и дальнейшего культивирования клеток из ОВ человека. НСПК выявлялись методом иммунофлуоресценции по одновременной экспрессии маркера стволовых клеток Sox-2 и маркера ранней нейральной дифференцировки nestin. ОК выявлялись по коэкспрессии маркера GFAP (кислого глиального фибриллярного белка) и p75NTR (низкоаффинного рецептора фактора роста нервов).

Результаты и их обсуждение. Разработаны оптимальные протоколы получения и культивирования 1) НСПК из обонятельного эпителия ОВ и 2) ОК из собственной пластинки эпителия ОВ. Для получения культуры НСПК на первом этапе проводили культивирование обонятельного эпителия в среде DMEM/F12 + L-glutamine + 10% FBS + 1% anti-anti + 1% gentamicine в течение 5–7 дней до образования монослоя. Методом иммунофлуоресценции в обонятельном эпителии ОВ были выявлены НСПК по коэкспрессии nestin и Sox-2. На втором этапе полученные клетки культивировали в бессывороточной среде DMEM/F12+L-glutamine+1% anti-anti+1% gentamicine+1% ITS+EGF+FGF на чашках, покрытых poly-L-lys, в течение 4–5 дней. В результате были получены нейросферы, состоявшие из НСПК. Для получения культуры ОК наиболее предпочтительным оказалось культивирование в среде DMEM/F12+L-glutamine+10% FBS+1% ITS+1% anti-anti+1% gentamicine на чашках, покрытых poly-L-lys. ОК были выявлялены по коэкспрессии маркера GFAP и p75NTR. В многочисленных работах с использованием различных типов клеток: эмбриональных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных клеток, мезенхимальных стволовых клеток, Шванновских клеток и др. были получены положительные результаты с восстановлением сенсорной и моторной функций спинного мозга. Однако использование некоторых их них связано с определёнными методическими и этическими проблемами, применение некоторых типов клеток малоэффективно или приводит к возникновению побочных эффектов. Получение ОВ является процедурой доступной и безопасной для пациентов, а клетки ОВ являются тканеспецифичными и аутологичными, т.к. они могут быть получены от пациента с травмой спинного мозга, и после наращивания в культуре и направленной дифференцировки трансплантированы тому же пациенту. Такие преимущества клеток ОВ делают их наиболее перспективными и открывают широкие возможности их применения в клеточной терапии посттравматических кист спинного мозга.

Заключение. Показано, что в ОВ человека присутствуют НСПК и ОК. После наращивания клеток ОВ в культуре и направленной дифференцировки получены культуры НСПК и ОК. Разработанные оптимальные протоколы получения и культивирования НСПК и ОК из ОВ человека воспроизводимы, и будут использованы нами в дальнейшем для изучения терапевтического эффекта на посттравматические кисты спинного мозга.

Литература

1. Human adult olfactory neural progenitors promote axotomized rubrospinal tract axonal reinnervation and locomotor recovery /

Xiao M., Klueber K. M., Guo Z., Lu C., Wang H., Roisen F. J. // Neurobiol. Dis.— 2007.— Vol. 26, № 2.— P. 363–374.
2. *Li J., Lepski G.* Cell transplantation for spinal cord injury: a systematic review // Biomed. Res. Int.— 2013.— Vol. 2013.— Art. ID 786475.— 32 pp.
3. *Mackay-Sim A.* Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa // Arch. Ital. Biol.— 2010.— Vol. 148, № 2.— P. 47–58.
4. *Ramón-Cueto A., Avila J.* Olfactory ensheathing glia: properties and function // Brain Res. Bull.— 1998.— Vol. 46, № 3.— P. 175–187.

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ГЕТЕРОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ СМЕСЯХ

[1,2]Э. Б. Дашинимаев, [2,3]А. С. Артюхов, [2]Н. В. Мещерякова, [1,2]Е. А. Воротеляк, [1]А. В. Васильев
[1]Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия
[2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия
[3]Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Московская область, Россия

dashinimaev@gmail.com

Введение. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) [1], являются перспективным источником биоматериала для нужд регенеративной медицины. При помощи направленной дифференцировки из ИПСК можно получить весь спектр стволовых клеток и клеток-предшественников разных типов для восстановления поврежденных и дегенерирующих тканей, в сколь угодно больших масштабах [2]. Однако сами ИПСК попав в организм с иммунодефицитом или иммунной совместимостью могут дать начало злокачественным новообразованиям — тератомам [3]. Поэтому очень важно иметь способ определения остаточного содержания ИПСК в биомедицинских клеточных продуктах, которые будут предназначены для трансплантации в организм пациентов.

Цель — провести модельный эксперимент по поиску ИПСК в гетерогенных клеточных смесях.

Материалы и методы. В качестве модельных культур клеток мы использовали три культуры плюрипотентных стволовых клеток (2 линии ИПСК: IPS-KYOU, IPS-DYP0730, и одна линия эмбриональных стволовых клеток: hES) и три культуры фибробластов кожи человека (1608-hTERT, Detroit 532, ПФЧ-О). Мы смешали культуры ИПСК человека и фибробластов кожи человека в разных пропорциях: 1 к 1, 1 к 10, 1 к 100, 1 к 1000, 1 к 10 000 и 1 к 100 000. Полученные смеси анализировали тремя разными способами поиска ИПСК: Методом проточной цитофлуориметрии (по наличию маркера TRA-1–60), методом ОТ-ПЦР в реальном времени и методом цифрового капельного ОТ-ПЦР (по уровню экспрессии генов Oct4, Lin28, TDGF1). Для количественного измерения уровня экспрессии генов проводили нормировку по трем генам «домашнего хозяйства» (C1orf43, PSMB4, REEP5). Каждый эксперимент с количественным анализом результатов был проведен в нескольких независимых повторениях (как минимум трехкратно), были посчитаны погрешности (среднеквадратичное отклонение). Статистическую достоверность разделения результатов определяли при помощи расчета t-критерия Стьюдента с подсчетом p-величины

Результаты и обсуждение. Мы установили, что каждый метод, имея свои недостатки и преимущества перед другими, способен находить ИПСК в клеточных смесях с разной чувствительностью. Так, оказалось, что метод проточной цитофлуориметрии способен статистически достоверно определить наличие ИПСК с содержанием не менее 1%. Для ПЦР-методов, мы проанализировали уровни экспрессии 12 генов маркеров плюрипотентных стволовых клеток (Oct4, Sox2, Nanog, DPPA4, DNMT3, ETS2, REX1, GABRB3, FGF4, GDF3, TDGF1, Lin28, ESG1) и выбрали набор из трех генов Oct4. TDGF1, Lin28, уровни экспрессия которых наиболее оптимально позволяет разделять плюрипотентные стволовые клетки и обычные соматические. В итоге метод ОТ-ПЦР в реальном времени показал способность достоверно определить содержание ИПСК не менее 0,017%, и метод цифрового капельного ОТ-ПЦР показал способность достоверно определить содержание ИПСК не менее 0,002%.

Заключение. Таким образом, мы показали практическую возможность поиска ИПСК в гетерогенных клеточных смесях, нами были подобраны условия проведения тестов, определены чувствительности разных способов и сформированы рекомендации для дальнейшей валидации предложенных методов.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках соглашения о предоставлении субсидии № 14.610.21.0001 (RFMEFI61014X0001).

Литература

1. *Takahashi K. L., Okita K., Nakagawa M., Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures // Nat. Protoc. 2007. № 2 (12). P. 3081–9.
2. *Ohnuki M., Takahashi K.* Present and future challenges of induced pluripotent stem cells // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015. Oct. № 19. P. 370 (1680). 20140367.
3. The tumourigenicity of iPS cells and their differentiated derivates / Liu Z., Tang Y., Lü S., Zhou J., Du Z., Duan C., Li Z., Wang C. // J Cell Mol Med. 2013. Jun. № 17 (6). P. 782–791.

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ГОТОВЫХ БЛЮД НА ПИЩЕВОЙ ТЕРМОГЕНЕЗ

Н. П. Егоренкова
Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии, Москва, Россия
nata6082008@rambler.ru

Пищевой термогенез наряду с такими параметрами как основной обмен и энерготраты физической активности является важной частью энерготрат. При этом если основной обмен отражает интенсивность энергетического обмена в целом, то пищевой термогенез является отображением физиологических и метаболических особенностей усвоения пищи.

Величина пищевого термогенеза зависит от химического состава пищи [1, 2]. Среди макронутриентов термическая реакция белков считается максимальной по сравнению с углеводами и жирами [1–3]. Поэтому пищевой термогенез пищи, различающейся по составу будет также различным.

Цель: оценить влияние химического состава готовых блюд на примере традиционных каш, творога и сливочного масла на пищевой термогенез.

Материалы и методы. Работа проводилась на базе ФГБНУ ««ФИЦ питания и биотехнологии». В исследование включено 40 человек (мужчины и женщины, возраст составлял от 25 до 60 лет). Все тестовые завтраки проводились на одной группе пациентов. Пищевой термогенез измеряли методом непрямой калориметрии на метабографе «Medgraphics», США. Значения пищевого термогенеза измерялись: натощак, через 10, 60, 120, 180, 240 мин после завтрака. Всего было проведено 1200 измерений пищевого термогенеза. Состав пищевых тестов на 100 ккал составлял: пшенная каша (белки — 10,2, жиры — 28, углеводы — 62), овсяная каша (белки — 9,6, жиры — 33,8, углеводы — 57), гречневая каша (белки — 11,8, жиры — 30,2, углеводы — 58), творог (белки — 82,4, жиры — 5,0, углеводы — 97,3), сливочное масло+ржаной хлеб (белки — 4,1, жиры — 72,1, углеводы — 23,78).

Результаты и их обсуждение. Большинством исследований показано, что величина пищевого термогенеза зависит от химического состава пищи [1, 2, 4]. Среди макронутриентов термическая реакция белков является максимальной [4–6]. Углеводы обладают меньшим пищевым термогенезом. У жиров — самый низкий. [3]. На пищевой термогенез белка также может влиять аминокислотный состав [5]. Жирные кислоты способны по-разному влиять на термогенез жиров [3]. Также и от состава углеводов зависит интенсивность термической реакции суммарных углеводов пищи. Поэтому данные по термогенезу белков, жиров и углеводов различны при исследовании различных пищевых нагрузок [4, 6, 7].

В нашей работе мы изучали пищевой термогенез стандартизованных пищевых нагрузок, преимущественно белковой, жировой или углеводной природы. Одной из задач нашей работы была сравнительная оценка термогенеза пищевой нагрузки.

Величина термогенеза (% от калорийности) для обезжиренного творога составила 29,73, сливочного масла — 12,9, каш — 18,38. На основании термогенеза пищевых тестов был рассчитан термогенез чистых белков, жиров и углеводов. Термогенез белка составил 31,94±1,4%, термогенез жира — 9,66±0,44%, термогенез углеводов — 18,66±0,82. Результаты показывают, что пищевой термогенез белка является достаточно высоким, промежуточным значением обладают углеводы, пищевой термогенез жира самый низкий [6, 7].

Пищевой термогенез является величиной обратной усваиваемости. Пищевой термогенез белка в 32% означает, что утилизируется только 68% калорийности белка, а 32% это затраты энергии на всасывание и переваривание. Таким образом, эффективность утилизации белка в данном случае составляет 68%. Термогенный эффект жиров в 9,7%, означает, что эффективность утилизации жиров составляет более 90%. Термогенез углеводов в 18,7% соответствует эффективности утилизации в 81%.

Таким образом, химический состав пищи влияет на термогенез. Самый высокий термогенез у белков. Промежуточное значение занимают углеводы. Самый низкий термогенез у жиров. Соответственно, продукт, обогащенный белком, будет наиболее термогенным. А жировой — наиболее усваиваемый за счет низкого термогенеза. Комбинированный продукт в зависимости от соотношения белков, жиров и углеводов будет обладать термогенезом от 10 до 30% [7]. Данные, полученные нами по термогенезу чистых белков жиров и углеводов, позволяют рассчитать пищевой термогенез любого продукта, состав которого известен. Практическое применение пищевой термогенез находит при расчётах энергетической ценности рационов питания, а также, вполне может служить дополнительной характеристикой к таблице химического состава продуктов питания. А индивидуальные особенности термогенеза белков, жиров и углеводов целесообразно использовать как дополнительный диагностический критерий метаболического или энергетического статуса в клинической практике.

Литература

1. *De Jonge L., Bray G. A.* The thermic effect of food is reduced in obesity // Nutr Rev.— 2002.— Vol. 60.— P. 295–297.
2. *Westerterp-Plantenga M. S.* The significance of protein in food intake and body weight regulation // Curr Opin Clin Nutr Metab Care.— 2003.— Vol. 6 (6).— P. 635–638.
3. *Jones P. J., Jew S., Abu Mweis S.* The effect of dietary oleic, linoleic, and linolenic acids on fat oxidation and energy expenditure in healthy men // Metabolism.— 2008.— Vol. 57.— P. 1198–203.
4. *Westerterp-Plantenga M. S., Nieuwenhuizen A., Tomé D, et al.* Dietary protein, weight loss, and weight maintenance // Annu Rev Nutr.— 2009.— Vol. 29.— P. 21–41.
5. Consultation RFE: Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition. 2011, Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of The United Nations.

6. *Tentolouris N., Pavlatos S., Kokkinos A., et al.* Diet-induced thermogenesis and substrate oxidation are not different between lean and obese women after two different isocaloric meals, one rich in protein and one rich in fat // Metabolism.— 2008.— Vol. 57 (3).— P. 313–20.
7. *Westerterp K. R.* Diet induced thermogenesis.// Nutr Metab (Lond).— 2004.— Vol. 1.— P. 5–10.

СОЧЕТАННОЕ ПРОТИВОМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ С ПРИМЕНЯЕМЫМИ В КЛИНИКЕ АНТИБИОТИКАМИ

[1]*М. С. Жаркова*, [1,2]*Д. С. Орлов*, [1,2]*О. В. Шамова*
[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

manyvel@mail.ru

Введение. Антимикробные пептиды (АМП) и белки являются одними из ключевых эффекторных молекул врождённого иммунитета человека и животных. Эта группа соединений обладает широким спектром антимикробного действия, в частности, против мультирезистентных, устойчивых к применяемым в клинике антибиотикам микроорганизмов, тогда как вероятность развития резистентности к самим АМП полагают низкой. Проблема борьбы с микробной резистентностью является одной из причин, вызывающих пристальный интерес к этим соединениям как к перспективным моделям, на основе которых возможно создание новых лекарственных средств. Однако сравнительно высокая токсичность многих АМП в отношении эукариотических клеток, которую связывают с их неферментативным мембранолитическим механизмом действия, является одним из препятствий к их внедрению в клиническую практику. Взаимное синергетическое усиление активности, возможное при совместном применении различных антибиотических агентов, может позволить снизить эффективные концентрации данных веществ и, соответственно, уменьшить токсические эффекты. Помимо этого, изучение совместного действия АМП человека и конвенциальных антибиотиков представляет интерес в контексте возможного взаимодействия эндогенных и экзогенных антибиотических веществ в организме человека при лекарственной терапии.

Цель работы заключалась в изучении совместного действия *in vitro* АМП человека (LL-37, альфа-дефенсинов HNP1 и HNP4, бета-дефенсинов hBD2 и hBD3), а также высокоактивных белков и пептидов животного происхождения протегрина-1 (PG-1) свиньи, бактенецина 3,4 (ChBac3,4) козы и лизоцима с клиническими антибиотиками, имеющими различный механизм антимикробного действия (рифампицином, гентамицином, офлоксацином, оксациллином, полимиксином B) против грамотрицательных бактерий: *E.coli* ML-35p и клинического изолята *A.baumannii* — и грамположительных бактерий: устойчивого к метициллину штамма *S.aureus* (MRSA ATCC 33591) и *M.luteus* CIP A270.

Материалы и методы. Использовали химически синтезированные АМП, идентичные по структуре природным, и лизоцим из белка куриных яиц (BioChemica, США). АМП человека были произведены Peptide Institute, Inc (Япония), синтез ChBac3,4 был выполнен в ГосНИИ ОЧБ (РФ). PG-1, а также бактериальные штаммы *E.coli* ML-35p и MRSA ATCC 33591 были любезно предоставлены профессором Р. Лерером (Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США). Рифампицин, оксациллин и полимиксин B были фирмы Sigma, США, гентамицин — Shandong Weifang Pharm. Factory Co., КНР, офлоксацин — ОАО Синтез, РФ. *M.luteus* CIP A270 был предоставлен сотрудниками отдела Молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ», а клинический изолят *A.baumannii* — сотрудниками НИИ Травматогии и ортопедии им. Вредена.

Оценку характера совместного антибактериального действия АМП и других антибиотических агентов осуществляли *методом серийных разведений по схеме «шахматной доски»* («Checkerboard titrations») [1], по результатам которого рассчитывали минимальные индексы фракциональной ингибирующей концентрации иФИК=[A]/[МИК A]+[B]/[МИК B], где [A] и [B] — концентрации компонент A и B в смеси, ингибирующей рост микроорганизма, а МИК A и МИК B — индивидуальные минимальные ингибирующие рост микроорганизма концентрации веществ A и B, которые предварительно измеряли методом серийных разведений препарата в жидкой питательной среде, содержащей микроорганизмы, в модификации, описанной в [2]. Минимальный иФИК$\leqslant$0,5 расценивали как синергизм; 0,5<иФИК$\leqslant$2 — как аддитивность или независимое действие; иФИК>2 — как антагонизм [3].

Результаты и обсуждение. Наличие синергетического эффекта было выявлено для комбинаций (1) гентамицина с PG-1 и hBD-3 в отношении грамотрицательных микроорганизмов, с LL-37, HNP-1, hBD-2, hBD-3 и PG-1 в отношении грамположительного штамма *M.luteus* CIP A270; (2) рифампицина с ChBac3,4 в отношении *E.coli* ML-35p, с HNP-1 и hBD-3 в отношении MRSA ATCC 33591 и с hBD-2 в отношении клинического изолята *A.baumannii*; (3) офлоксацина с ChBac3,4 в отношении *M.luteus* CIP A270; (4) оксациллина с ChBac3,4 в отно-

шении MRSA ATCC 33591; (5) полимиксина B с лизоцимом в отношении грамотрицательных бактерий и с hBD-2 в отношении M.luteus CIP A270. Таким образом, наиболее часто синергизм наблюдался между АМП, обладающими выраженным действием на проницаемость бактериальных мембран (бета-дефенсины, PG-1, LL-37), и антибиотиками, влияющими на синтез белка и нуклеиновых кислот (гентамицин, рифампицин), которым требуется проникнуть внутрь клетки. Это говорит в пользу модели повышения биодоступности (т.е. облегчения проникновения антибиотика к молекулярным мишеням его действия в присутствии АМП) как возможного объяснения подобного синергизма. Аналогичная модель применима для сочетания лизоцима и полимиксина B, где повреждение антибиотиком внешней липидной мембраны грамотрицательных бактерий может облегчить доступ мурамидазы (то есть лизоцима) к пептидогликановому слою. Следует также отметить, что случаев антагонизма противомикробного действия среди рассмотренных сочетаний выявлено не было; для не показавших синергизма комбинаций наблюдался аддитивный эффект.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения антимикробных пептидов и белков в сочетании с другими антибиотическими препаратами.

Литература

1. Antibacterial peptide protocols / Ed. by W. Shafer.— Totowa N. J.: Humana Press Inc., 1998.— 255 p.
2. *Orhan G., Bayram A., Zer Y., Balci I.* Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against Brucella melitensis // J. Clin. Microbiol.— 2005.— Vol. 43, № 1.— P. 140–143.
3. *Hsieh M. H., Yu C. M., Yu V. L., Chow J. W.* Synergy assessed by checkerboard. A critical analysis // Diagn. Microbiol. Infect. Dis.— 1993.— Vol. 16, № 4.— P. 343–349.

МЕХАНИЗМ RAB5-RAB7-КОНВЕРСИИ В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА ЭФР-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

[1]Р. С. Каменцева, [1]В. В. Кошеверова, [1]М. В. Харченко, [1,2]Е. С. Корнилова
[1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

rkamentseva@yandex.ru

Введение. Рецептор эпидермального фактора роста (ЭФР) — одна из наиболее изученных рецепторных тирозинкиназ, оверэкспрессия которой регистрируется во многих типах опухолей. Эндоцитоз рецептора ЭФР является механизмом, регулирующим ЭФР-зависимые сигнальные пути и в норме обеспечивающим десенситизацию рецептора. После интернализации на первичные эндосомы, несущие рецептор, привлекается малая ГТФаза Rab5 — регулятор ранних этапов эндоцитоза. Ранний эндосомальный аутоантиген 1 (EEA1), один из эффекторов Rab5, опосредует гомотипические слияния ранних эндосом. В результате слияний площадь мембраны эндосомы увеличивается, что делает возможным формирование на поздних этапах эндоцитоза внутренних пузырьков мультивезикулярных тел, в которых рецептор ЭФР становится доступным для лизосомальных гидролаз. Согласно существующим представлениям EEA1 привлекается на мембрану эндосомы из цитоплазмы, однако, было показано, что в клетках, депривированных по сыворотке, в которых уровень эндоцитоза ростовых факторов минимален, EEA1 тем не менее локализуется на мембранах везикул. На основании исследования фиксированных препаратов была предложена гипотеза, согласно которой EEA1-позитивные везикулы формируют гибридные эндосомы с везикулами, несущими груз, функционируют как платформа для слияний и затем сегрегируют, чтобы вступить в новый цикл [1]. Считается, что локализация и активность EEA1 определяется наличием на эндосоме активного Rab5, однако, на поздних этапах эндоцитоза происходит так называемая Rab5-Rab7-конверсия, в результате которой на эндосоме появляется регулятор поздних этапов эндоцитоза Rab7, а все эффекторы Rab5 диссоциируют. Согласно общепринятой гипотезе, основанной на исследовании эндоцитоза BSA или LDL, конверсия происходит путем постепенной диссоциации Rab5 и ассоциации Rab7 на одном и том же участке мембраны [2, 3]. Согласно альтернативной модели, которая была показана при эндоцитозе вирусов, Rab5 и Rab7 изначально связываются с разными мембранными доменами, и при конверсии Rab5 отщепляется в виде везикулы [4]. Таким образом, вопрос о том, каковы механизмы Rab5-Rab7-конверсии при эндоцитозе рецептора ЭФР, остается открытым.

Материалы и методы. Для работы использовали клеточную линию HeLa. Стимуляция эндоцитоза рецептора ЭФР проводилась путем добавления ЭФР, конъюгированного с квантовыми точками (Qds). Исследование проводилось с использованием микроскопа Leica TCS SP5.

Результаты и их обсуждение. Мы оценили динамику эндоцитоза рецептора ЭФР, в клетках, экспрессирующих Rab7-DsRed. Колокализация ЭФР-Qds и EEA1 снижалась между 30 и 45 мин после стимуляции эндоцитоза — именно в этот период времени, по-видимому, происходит смена регуляторных белков. Обнаружено, что Rab7 привлекается на гибридные эндосомы уже через 20 мин после стимуляции эндоцитоза.

В ходе прижизненной микроскопии клеток, ко-трансфецированных плазмидами, кодирующими EEA1-EGFP и Rab5-mCherry, мы показали, что EEA1 и Rab5 отделяются от гибридной эндосомы в составе одной везикулы.

При этом анализ живых клеток, экспрессирующих EEA1-GFP и Rab7-DsRed, показал, что ЭФР-позитивная везикула, отделяющаяся от EEA1-положительного домена, несет на своей мембране Rab7, что согласуется с данными, полученными на фиксированных клетках.

Таким образом, наши данные свидетельствуют в пользу модели, которая заключается поддержании и последующей сегрегации мембранных доменов, несущих разные ГТФазы, в пределах одной гибридной эндосомы. Мы предполагаем, что тип груза может определять способ Rab5-Rab7-конверсии. Так, вирусы и рецептор ЭФР в ходе эндоцитоза могут стимулировать сигнальные каскады, регулирующие компоненты эндоцитозного пути, а также запускающие формирование мембранных доменов. Напротив, при эндоцитозе BSA, маркера жидкофазного эндоцитоза, и LDL, рецептор которого после диссоциации лиганд-рецепторных комплексов быстро рециклирует из ранней эндосомы на ПМ, поздние стадии процесса проходят пассивно, и регуляторные белки, вероятно, распределены на мембране эндосомы равномерно, что делает невозможным их замену путем сегрегации.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00068) и при финансовой поддержке ФАНО с использованием оборудования РЦ РМиКТ СПбГУ.

Литература

1. *Злобина М. В., Харченко М. В., Корнилова Е. С.* Анализ динамики эндоцитоза рецептора ЭФР на основе обработки изображений, полученных с помощью конфокальной световой микроскопии на фиксированных клетках // Цитология — 2013 — Т. 55, № 5 — С. 348–357.
2. *Rink J., Ghigo E., Kalaidzidis Y., Zerial M.* Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes //Cell.— 2005.— Т. 122, № 5.— С. 735–749.
3. *Poteryaev D., Datta S., Ackema K., Zerial M., Spang A.* Identification of the switch in early-to-late endosome transition // Cell.— 2010.— Т. 141, № 3.— С. 497–508.
4. *Vonderheit A., Helenius A.* Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes // PLoS Biol.— 2005.— Т. 3, № 7.— С. e233.

ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ ОСТЕОЗАМЕЩАЮЩИХ МАТЕРИАЛОВ С МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ДЛЯ ПЛАСТИКИ ДЕФЕКТОВ ПРИ КОСТНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

[1,2]Е. С. Касьянова, [2]С. А. Александрова, [3]М. С. Сердобинцев
[1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия
[3]Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения РФ, Россия

k_elisa@bk.ru

Введение. Среди всех локализаций туберкулеза костно-суставной туберкулез выявляется у 10% заболевших. На месте поражения микобактериями развивается воспалительная реакция, приводящая к образованию полости. При санировании формируется фиброзная ткань, недостаточно приспособленная к выдерживанию нагрузок. Сотрудниками отделения фтизиоостеологии и ортопедии СПб НИИФ были проведены исследования по экспериментальному обоснованию ряда остеозамещающих материалов в хирургии костно-суставного туберкулеза [1, 2]. Однако опыт по использованию материалов выявил необходимость дополнительной стимуляции регенерации костной ткани. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) костного мозга обладают рядом свойств, влияющих на эффективность регенеративных процессов. Показана способность ММСК к дифференцировке в остеогенном направлении, миграции к местам повреждения, стимуляции пролиферации местных стволовых клеток, усилению ангиогенеза, противовоспалительному и антифибротическому действию [3]. Использование тканеинженерных эквивалентов кости (ТИЭК), состоящих из остеозамещающего биоматериала и ММСК может оказаться перспективным методом в восстановительной хирургии костной ткани.

Цель работы — оценить биосовместимость остеозамещающих материалов для клеток остеогенной природы с целью последующего использования в составе ТИЭК для пластики дефектов костного туберкулеза.

Материалы и методы исследования. Первичную культуру ММСК костного мозга новорожденного кролика культивировали в питательной среде aMEM (Sigma, США) с 10% СЭК (Hyclone, США). Для получения культуры клеток с остеогенными свойствами ММСК 4–5 пассажа помещали в остеогенную дифференцировочную среду StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Life Technologies, США) на 5 суток

В качестве биоматериалов для ТИЭК исследовали: стеклокристаллический биоситалл силикоалюмофосфатной группы Биосит-Ср «Элкор» (Элкор, Санкт-Петербург); кристаллический сульфат кальция, содержащий 4%-й тобрамицин Osteoset T (Wright Medical Technology, USA); децеллюризованный матрикс бычьей кости Orthoss (Geistlich, Germany)

и коллаген-гидроксилапатитовый композит ЛитАр (Самара, Россия).

Биосовместимость материала для клеток оценивали методами: 1) сканирующей электронной микроскопии после нанесения клеточной суспензии на образцы; при инкубации в течение 1 суток оценивали способность остеоцитов к прикреплению и распластыванию на поверхности материалов, при инкубации в течение 7 суток — наличие клеток и их состояние; 2) колориметрии на основе МТТ-теста (выявление активности митохондрий у жизнеспособных клеток) после инкубации клеток в экстрактах материалов. Экстракты подготавливались в соответствии с ГОСТ ISO 10993.5-2011. После 1-суточной инкубации клеток в высокой плотности посева в экстрактах материалов проводили количественную оценку жизнеспособных клеток по отношению к контролю, что позволяло судить о цитотоксичности материалов. После 7-суточной инкубации клеток в низкой плотности посева в экстрактах материалов оценивали пролиферативную активность клеток.

Результаты и их обсуждение. Проведенные исследования продемонстрировали, что ММСК, дифференцированные в остеогенном направлении, в течение 1 суток прикреплялись к поверхности гранул Биосит Ср-«Элкор» и распластывались. Через 7 суток инкубации на материале можно было наблюдать формирование монослоя. Оценка цитотоксичности экстракта материала с помощью МТТ-теста выявила 99,91±13,1% жизнеспособных клеток. Пролиферативная активность также не отличалась от контроля (103,08±3,6%).

На поверхности материала Osteoset T в течение 1 суток клетки прикреплялись, распластывались и располагались в виде монослоя. Однако на снимках СЭМ, сделанных после 7-суточной инкубации, можно было видеть лишь отдельные гипертрофированные клетки. На поверхности материала Orthoss после инкуации в течение 1 суток наблюдали единичные адгезировавшие остеогенные клетки с небольшими филоподиями, а через 7 суток — отдельные округлые клетки. Среди пластин композита ЛитАр наблюдали клеточные конгломераты на обоих сроках исследования. Жизнеспособность и пролиферативная активность остеогенных клеток на этих трех материалах составляли от 40 до 60% по отношению к контролю.

Заключение. Обобщая полученные результаты, можно заключить, что наибольшей биосовместимостью обладает материал Биосит-Ср «Элкор». Среди исследованных материалов целесообразнее использовать его в качестве носителей для остеогенных клеток при создании ТИЭК.

Литература

1. *Сердобинцев М. С., Кафтырев А. С., Бердес А. И., Луцкая О. Л.* Пластика дефектов кости остеозамещающими материалами в хирургии туберкулезного коксита (клинико-экспериментальное исследование) // Медицинский альянс.— 2014.— № 1. С. 31–36.
2. Экспериментальное обоснование применения ксенотрансплантата Orthoss в хирургии костно-суставного туберкулеза / Сердобинцев М. С., Лобач В. Ю., Кафтырев А. С., Виноградова Т. И., Заболотных Н. В., Витовская М. Л., Луцкая О. Л., Искровский С. В. // Туберкулез и болезни легких.— 2015.— № 6. С. 135.
3. *Prockop D. J., Kota D. J., Bazhanov N., Reger R. L.* Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs) // J. Cell. Mol. Med.— 2010.— Vol. 14 (9). P. 2190–2199.

ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУРАХ. РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-KB

[1,2]М. И. Кобякова, [1,2]Р. С. Фадеев, [1]М. Е. Соловьёва, [1,2]В. С. Акатов

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

[2]Пущинский государственный естественно-научный институт, Россия

fadeevrs@gmail.com

Ранее нами было показано повышение устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) к индукции клеточной гибели при активации гомотипической межклеточной адгезии в многоклеточных структурах (агрегатах) [1, 2]. Однако молекулярные механизмы данного явления остаются не изученными. В данном исследовании было проведено изучение роли транскрипционного фактора NF-kB в реализации устойчивости клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах.

В качестве объекта исследования использовали клетки ОМЛ человека линии THP-1, формирующие спонтанные многоклеточные агрегаты. Для формирования многоклеточных агрегатов 96-луночные планшеты покрывали 1,5% раствором агарозы (Panreac, Испания). Затем высевали по 5×103 клеток в лунку в 100 мкл полной ростовой среды. В качестве активатора клеточной гибели использовали индуктор рецептор-опосредованного апоптоза человеческий рекомбинантный белок izTRAIL. В качестве низкомолекулярных ингибиторов транскрипционной активности NF-kB использовали соединения NF-kB Activation Inhibitor IV (Calbiochem, USA) и JSH-23 (Calbiochem, USA). Уровень активации транскрипционного фактора NF-kB определяли по уровню фосфорилированного RelA (p65) в клетках до и после инкубации с низкомолекулярными ингибиторами активации NF-kB. Измерение уровня фосфорилированного

RelA (p65) проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) с использованием коммерческого набора NFkB p65 (Total/Phospho) InstantOne™ ELISA (Ebioscience, США), в соответствии с рекомендациями производителя.

Показано, что в многоклеточных агрегатах происходило повышение устойчивости клеток ОМЛ линии THP-1 к действию рекомбинантного белка izTRAIL. Использование низкомолекулярных ингибиторов активации транскрипционного фактора NF-kB — NF-kB Activation Inhibitor IV и JSH-23 снижало количество устойчивых клеток в многоклеточных агрегатах к действию izTRAIL. Снижение числа устойчивых клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу при применении низкомолекулярного ингибитора JSH-23 было менее выражено, чем при использовании ингибитора NF-kB Activation Inhibitor IV. Далее нами было показано, что при применении низкомолекулярных ингибиторов NF-kB Activation Inhibitor IV и JSH-23 происходило снижение уровня фосфорилированного RelA (p65), основного маркера активации транскрипционного фактора NF-kB.

Таким образом, подавление активации транскрипционного фактора NF-kB приводило к подавлению устойчивости клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах к TRAIL-индуцированному апоптозу. Полученные данные указывают на возможную роль транскрипционного фактора NF-kB в реализации устойчивости клеток ОМЛ в многоклеточных структурах к индукции клеточной гибели.

Работа выполнена при финансовой поддержке стипендиального гранта Президента РФ (СП-СП-1519.2015.4), а также гранта Правительства РФ (№14.Z50.31.0028).

Литература

1. Повышение лекарственной устойчивости клеток острого миелобластного лейкоза в многоклеточных агрегатах in vitro / Захаров С. Г., Голенков А. К., Митина Т. А., Луцкая Т. Д., Белоусов К. А., Фадеев Р. С., Соловьева М. Е., Сенотов А. С., Акатов В. С. // Альманах клинической медицины.— 2014.— № 1 (31). С. 11–16.
2. Клеточная агрегация повышает лекарственную устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза / Фадеев Р. С., Соловьева М. Е., Слядовский Д. А., Захаров С. Г., Фадеева И. С., Сенотов А. С., Долгих Н. В., Голенков А. К., Акатов В. С. // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии.— 2015.— № 32 (2).— С. 125–134.

ПРИМЕНЕНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЕЗНИ ГИРШПРУНГА

[1]И. А. Комиссаров, [2]Н. В. Смирнова, [1]Р. Г. Стояновский, [1]А. В. Бердиков, [1]В. П. Карушев, [1]С. С. Денисов
[1]Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Россия
[2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия

explabgpmu@gmail.com

Введение. Болезнь Гиршпрунга (врождённый аганглиоз толстой кишки) — распространённая патология, встречающаяся с частотой 1:5000 новорожденных. До настоящего времени лечение болезни Гиршпрунга осуществляется только с помощью хирургического вмешетельства. Все применяемые на сегодня операции высокотравматичны и опасны своими осложнениями [1]. В связи с этим возникла необходимость создания нового, малоинвазивного, патогенетически обоснованного метода лечения болезни Гиршпрунга [2]. Одним из наиболее перспективных направлений в исследовании новых методов лечения является применение технологий клеточной терапии [3]. Известны различные источники мезенхимных стволовых клеток, такие как пуповинная кровь, красный костный мозг, подкожная жировая клетчатка и некоторые другие. Подкожная жировая клетчатка обладает рядом преимуществ перед другими источниками, а именно: объем изымаемой у донора подкожной жировой ткани может составлять до 3000 мл, что значительно превышает объем материала из других источников, а концентрация стволовых клеток составляет до 10% ядерных клеток стромально-васкулярной фракции [4].

Целью настоящей работы стало исследование возможности применения аутологичных мезенхимных стволовых клеток подкожной жировой ткани в экспериментальном лечения болезни Гиршпрунга.

Объекты, материалы и методы исследования. В эксперименте было задействовано 50 самцов крыс линии Вистар, массой 200–230 г. Эксперимент был выполнен с соблюдением этических норм и правил гуманного обращения с лабораторными животными. Животных разделили на две группы: контрольную (n=20) и экспериментальную (n=30). На крысах обеих групп была смоделирована болезнь Гиршпрунга с применением 1%-го раствора глутамата натрия ($C_5H_8NO_4Na \times H_2O$). У крыс экспериментальной группы методом липэктомии получали по 0,2 мл подкожной жировой клетчатки. Из полученного образца подкожной клетчатки в условиях Лаборатории культивирования тканей выделяли стромально-васкулярную фракцию клеток. Выделение проводили методом ферментативной обработки, центрифугирования и фильтрации [4]. Полученные клетки культивировали на среде alfa-MEM с добавлением фетальной сыворотки телят,

глютамина, антибиотиков и антимикотиков. Клетки 2-го пассажа пересаживали и инкубировали в течение 48 ч на нейрональной дифференцировочной среде. Затем клетки вводили той же крысе, у которой был взят исходный материал (каждой крысе было введено 1×10^6 клеток). Клеточную трансплантацию осуществляли методом инфильтрации стенки дистального участка толстой кишки доступом через анальное отверстие. Через 5 суток после имплантации нейробластоподобных клеток животные были выведены из эксперимента. Дистальный участок толстой кишки отправляли на гистоморфологическое исследование. Животные, погибшие при моделировании болезни Гиршпрунга, в данную выборку включены не были. Статистическую обработку полученных данных не проводили в связи с малой численностью выборки.

Результаты и их обсуждение. После культивирования полученных стволовых клеток подкожной жировой ткани на нейрональной дифференцировочной среде при прижизненной микроскопии клетки имели морфологическое сходство с нервными клетками различной степени дифференцировки, а именно: крупные размеры, наличие отростков, образование единичных синапсов. Из 30 крыс экспериментальной группы 4 погибли в связи с индивидуальной реакцией на наркоз. Остальные 26 животных были выведены из эксперимента в соответствии с планом. При гистоморфологическом исследовании дистальных участков толстой кишки животных в обеих группах выявлены изменённые ганглии, в связи с чем отсутствует возможность достоверно определить, являются ли они результатом развития введённых нейробластоподобных клеток, или их наличие связано с несостоятельностью выбранной нами модели.

Заключение. Предложенный источник стволовых клеток и метод индукции их дифференцировки показал себя пригодным для дальнейших исследований в связи с тем, что из 30 полученных образцов подкожной жировой клетчатки крыс удалось успешно получить 30 образцов культур нейробластоподобных клеток,— это говорит о надёжности метода. Выбранный нами метод моделирования болезни Гиршпрунга не позволяет достоверно определить, являются ли выявленные при патоморфологическом исследовании ганглии результатом развития введённых нейробластоподобных клеток или результатом спонтанной регенерации. В случае успешной разработки клинического метода лечения болезни Гиршпрунга с применением аутологичных стволовых клеток подкожной жировой ткани будет получена возможность избегать тяжёлых операций, опасных своими осложнениями, проводя органосохраняющее лечение. Метод требует сравнительно небольших экономических затрат на организацию лаборатории и обучение персонала, что позволит воспроизводить его вне крупных центров.

Авторы благодарят РНФ (грант № 14-03-00003) за финансовую поддержку в проведении исследования.

Литература

1. *Козлов М. Ю.* Лапароскопические операции при болезни Гиршпрунга у детей. Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 2010.— 23 с.
2. *Wagner J. P., Sullins V. F., Khalil H. A., Dunn J. C.* A durable model of Hirschsprung's colon // J. Pediatr. Surg.— 2014.— Vol. 49, № 12.— P. 1804–1808.
3. *Kwok C. K., Tam P. K., Ngan E. S.* Potential use of skin-derived precursors (SKPs) in establishing a cell-based treatment model for Hirschsprung's disease // J. Pediatr. Surg.— 2013.— Vol. 48, № 3.— P. 619–628.
4. *Zuk P. A.* The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead // Mol. Biol. Cell.— 2010.— Vol. 21, № 11.— P. 1783–1787.

РАЗРАБОТКА, СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОЛИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ СЕМЕЙСТВА БАКТЕНЕЦИНОВ

[1]П. М. Копейкин, [2]Т. А. Лукьянова, [1,2]Д. С. Орлов, [1]Б. Л. Мильман, [1]А. Ю. Артамонов, [1,2]О. В. Шамова
[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

pmkopeikin@mail.ru

Введение. Антимикробные пептиды (АМП) — природные молекулы, содержащиеся в клетках системы врожденного иммунитета и играющую важную роль в защите организма человека и животных от инфекций. В настоящее время остро стоит проблема борьбы с бактериями, выработавшими резистентность к применяемым в медицине лекарственным препаратам, что определяет актуальность поиска принципиально новых антибиотических средств. АМП могут стать основой для разработки лекарственных препаратов нового поколения. Одним из главных препятствий практического применения АМП является их недостаточно высокая селективность — повреждающему действию пептидов могут подвергаться не только бактерии, но и собственные клетки макроорганизма. Для преодоления этой проблемы проводится изучение путей направленной модификации молекул, позволяющее создавать синтетические аналоги АМП с оптимизированными для практического применения свойствами.

Целью работы являлось сравнительное изучение биологической активности структурных аналогов природного пролин-богатого линейного пептида семейства бактенецинов — ChBac3.4.

Методы. Пептиды получены твердофазным методом с использованием Fmoc/tBu-стратегии на 2-хлортритилхлоридной смоле. Наращивание пептидной последовательности проводилось в автоматическом синтезаторе Symphony X (Protein Technologies, Inc.). Для временной защиты α-аминогрупп аминокислот применялась Fmoc-защита. Активация проводилась *in situ* под действием HCTU/N-этилморфолин в среде диметилформамида (ДМФ). Аминокислотная последовательность отщеплялась с полимера с одновременным удалением всех защитных групп под действием трифторуксуной кислоты с добавками H_2O/Tis (триизопропилсилан). Пептиды были очищены с помощью обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) и высушены. Чистота полученных пептидов была не менее 95%, что подтверждалось с помощью аналитического электрофореза, ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрического анализа (MALDI TOF). Антимикробную активность аналогов бактенецина ChBac3.4 определяли с помощью метода серийных разведений в жидкой питательной среде [1]. Влияние пептидов на проницаемость цитоплазматической мембраны бактерии *E.coli* ML35p для хромогенных маркеров исследовали по методике [2]. Гемолитическую активность в отношении эритроцитов человека оценивали, как описано [1], цитотоксичность для культивируемых клеток человека — с применением МТТ-теста [3].

Результаты и обсуждение. Объектом исследования послужил пролин-богатый антимикробный пептид лейкоцитов домашней козы ChBac3.4: RFRLPFRRPPIRIHPPPFYPPFRRFL-NH_2 [4]. Этот пептид проявляет высокую антимикрбную активность, а также некоторые цитотоксические свойства в отношении клеток млекопитающих. В задачи работы входило исследование особенностей структуры пептида и выявление их значимости для проявления его биологической активности. Синтезирован пептид, имеющий идентичную природному бактенецину ChBac3.4 аминокислотную последовательность — антимикробный пептид 1 (АП1), два N-концевых фрагмента ChBac3.4 — с 1 по 14 аминокислотный остаток — АП2 и с 1 по 19 — АП3, а также пептид, имеющий модификацию в участке с 12 по18 аминокислотный остаток — АП4. Показано, что все исследованные пептиды обладают антимикробной активностью в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ML35p, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* (клинический изолят) и грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* SG-511. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для АП1 составляли 0,5–4 мкМ; АП2 — 0,5–8 мкМ; АП3 — 4–16 мкМ; АП4 — 1–4 мкМ. Было установлено в отношении способности пептидов нарушать барьерную функцию бактериальных мембран, что только пептиды АП1 и АП4 вызывают увеличение проницаемости цитоплазматической мембраны для маркерных молекул, пептиды АП2 и АП3 оказались неэффективными (пептиды применяли в концентрациях, в 2 раза превышающих МИК). Исследуемые АМП не проявляли гемолитической активности на эритроциты человека в диапазоне концентраций 1–64 мкМ. По данным МТТ-теста пептиды АП1 и АП4 оказывали цитотоксическое действие *in vitro* в отношении клеток линии К-562 (клетки эритромиелоидного лейкоза человека) — 50% ингибирующие концентрации ($ИК_{50}$) составили 13,9 и 7,0 мкМ, соответственно. АП2 и АП3 имели значительно более низкие показатели ($ИК_{50}$ — 33 и 28 мкМ, соответственно).

Заключение. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что N-концевые области пептида важны для реализации его антибактериальных свойств, но не цитотоксической активности для эукариотических клеток, в то время как модификации участка молекулы 12–18, могут приводить к повышению цитотоксической активности аналогов ChBac3.4. Полученные данные содержат информацию об особенностях структуры бактенецина, важных для проявления его антимикробной активности и цитотоксических свойств. Продолжение исследований аналогов данного пептида позволит выяснить возможность повышения селективности антимикробного и противоопухолевого действия этих веществ, что может стать основой для разработки новых лекарственных средств.

Работа поддержана грантом ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (Соглашение № 14.604.21.0104). Идентификатор проекта RFMEFI60414X0104.

Литература

1. Antibacterial peptide protocols / Ed. by W. Shafer.— Totowa, N.J.: Humana Press Inc., 1997.— 250 p.
2. Артамонов А. Ю., Шамова О. В., Кокряков В., Орлов Д. С. Фото- и флюориметрические методы оценки проницаемости мембран E.coli ml-35p// Вестник Санкт-Петербургского университета.— 2008.— Сер. 3, №. 2.— С. 139–142.
3. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays// Journal of Immunological Methods.— 1983.— Vol. 65.— P. 55–63.
4. ChBac3.4: A Novel Proline-Rich Antimicrobial Peptidefrom Goat Leukocytes / Shamova O., Orlov D., Stegemann C., Czihal P., Hoffmann R., Brogden., Kolodkin N., Sakuta G., Tossi A., Sahl S., Kokryakov V., Lehrer R. // Int. J. Pept. Res. Ther.— 2009.— Vol. 15.— P. 107–119.

ЗАВИСИМОСТЬ СУТОЧНОГО РИТМА ВНУТРИГЛАЗНОГО ДАВЛЕНИЯ МЫШЕЙ ОТ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПОДТИПОВ АЛЬФА-1-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ

Н. В. Корсакова, Т. А. Малышкина
Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, Чебоксары, Россия
korsnv@rambler.ru

Введение. Известно, что гуморальная система организма оказывает существенное влияние на морфологическое [1, 2] и функциональное состояние тканей глаза, в том числе на регуляцию уровня внутриглазного давления глаза (ВГД) [3, 4]. Известно, что α-1-адренорецепторы принимают активное участие в регуляции, например, сужения зрачка, спазма артериол, снижения проницаемости сосудистой стенки, повышения артериального давления [5]. Аспект регуляции гидродинамики глаза под влиянием подтипов α-1-адренорецепторов остается без должного внимания и является актуальной и перспективной научной задачей.

Цель исследования. Изучить влияние альфа-1-адренорецепторов на суточный ритм внутриглазного давления мышей старше одного года.

Объекты, материалы и методы. Исследование проведено на 27 лабораторных мышах-самцов (экспериментальные группы) в возрасте от одного года до одного года и шести месяцев, имеющих генетический дефект по одному из трех подтипов α-1-адренорецепторов: α-1a, α-1b и α-1d. Группа контроля формирована из 6 интактных лабораторных мышей такого же возраста и пола. Все действия, предусматривавшие контакт с лабораторными животными, реализованы в соответствии с Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации и «Принципами надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р 53434–2009). Исследование проведено в период с октября 2015 года по январь 2016 года. Измерение уровня ВГД выполнено с помощью бесконтактного тонометра ICare-TonoLab-Tonometer, не требующего местной анестезии. Суточная тонометрия проведена утром и вечером в строго установленное время (с 08:00 до 09:00 и с 16:00 до 17:00). Статистическая обработка материала проведена с использованием стандартного пакета программы Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. В группе интактных старых мышей суточный ритм ВГД представлен следующим образом: 05,57±0,2 мм рт. ст. (утро), 08,79±0,22 мм рт. ст. (вечер). В экспериментальных группах старых мышей суточный ритм ВГД имеет следующие значения: 06,79±0,27 мм рт. ст. (утро), 10,38±0,29 мм рт. ст. (вечер); 10,02±0,29 мм рт. ст. (утро), 09,87±0,19 мм рт. ст. (вечер); 09,73±0,28 мм рт. ст. (утро), 11,43±0,46 мм рт. ст. (вечер), соответственно. Также выявлены отличия по высоте колебаний уровня ВГД между его минимальными и максимальными значениями в пределах одной серии измерений в течение одной минуты, которые в абсолютном выражении в контрольной группе равны 13 и 5 мм рт. ст.; в экспериментальных группах — 27 и 5 мм рт. ст.; 17 и 5 мм рт. ст.; 21 и 6 мм рт. ст., соответственно.

Результаты данного исследования могут быть экстраполированы на патогенез первичной открытоугольной глаукомы человека [4, 6, 7], имея важное значение для изучения фундаментальных патологических закономерностей и выявления групп повышенного риска развития этого социально значимого заболевания.

Выводы и заключение. 1) Выявлены важные отличия суточного ритма внутриглазного давления мышей, лишенных одного из трех подтипов α-1-адренорецепторов (с отсутствием α-1a-, α-1b- или α-1d-рецепторов. 2) Все старые мыши с дефектом в одном из трех подтипов α-1-адренорецепторов имеют более высокий уровень внутриглазного давления, чем интактные такого же возраста. 3) Вечерний уровень внутриглазного давления во всех изученных группах выше, чем утренний. 4) Максимальное колебание уровня внутриглазного давления (максимальная нестабильность гидродинамики глаза) демонстрируют мыши с отсутствием α-1a-адренорецептора, минимальное — мыши с отсутствием α-1d-рецептора.

Полученные результаты свидетельствуют о существенной физиологической роли названных подтипов альфа-1-адренорецепторов в регуляции и поддержании стабильности гидродинамики глаза, а также об участии названных рецепторов в патогенезе глазных заболеваний, связанных с повышением внутриглазного давления (глаукома), что требует дальнейшего детального изучения.

Литература

1. *Игнатьев С. Г., Шилкин Г. А., Ярцева Н. С., Игнатьева С. Г.* К вопросу о возрастных особенностях внутриглазной гидродинамики // Кубанский научный медицинский вестник.— 2011.— № 1.— С. 13–17.
2. *Корсакова Н. В., Григорьев В. Н., Сергеева В. Е.* Экспериментально-морфологическое обоснование десимпатизации глаза как нового способа вызывания катаракты // Морфология.— 2011.— Т. 140, № 6.— С. 57.
3. *Игнатьев С. Г., Шилкин Г. А., Ярцева Н. С., Игнатьева С. Г.* Клиническое значение физиологических особенностей внутриглазной гидродинамики // Национальный журнал глаукома.— 2011.— № 2.— С. 12–16.
4. *Корсакова Н. В.* Вид возрастной катаракты как доступный маркер социально значимых заболеваний // Успехи геронтологии.— 2015.— Т. 28, № 3.— С. 462–465.
5. *Guimaraes S., Moura D.* Vascular adrenoreceptors: an update // The Journal of Clinical Investigation.— 2002.— № 109 (6).— P. 765–775.
6. Нестеров А. П. Глаукома.— М.: Медицина, 2008.— 448 с.
7. *Terelak-Borys B., Czechowicz-Janicka K.* Investigation into the vasospastic mechanisms in the pathogenesis of glaucomatous neuropathy // Klin. Oczna. — 2011.— № 113 (7–9).— P. 201–208.

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И МРТ-ИЗМЕНЕНИЯ У БОЛЬНЫХ С УЛЬТРАВЫСОКИМ РИСКОМ РАЗВИТИЯ ШИЗОФРЕНИИ В ОКУЛОМОТОРНОЙ ПАРАДИГМЕ «GO/NO GO»

[1]*А. В. Котенев*, [1]*С. А. Карелин*, [2]*А. Томышев*, [1,2]*М. В. Славуцкая*
[1]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия
[2]Научный центр психического здоровья, Москва, Россия

pretencer@gmail.com

Введение. Саккадические движения глаз как компонент зрительного восприятия и внимания являются адекватной моделью для изучения природы когнитивного контроля двигательного поведения человека как в норме, так и при шизофрении.

Развитию шизофрении предшествует продромальная фаза или синдром «ультравысокого риска» (УВР) развития болезни, однако механизмы перехода продромальной фазы в шизофрению малоизучены.

Цель работы: анализ различий в поведенческих характеристиках здоровых испытуемых и больных с ультравысоким риском развития шизофрении при решении окуломоторного теста «go/no go».

Материалы и методы. Для изучения нарушения процессов внимания, принятия решения и произвольного торможения у больных с ультравысоким риском развития шизофрении использовали экспериментальную схему «go/no go».

Исследование проведено на 15 больных с ультравысоким риском развития шизофрении и 15 здоровых испытуемых (мужчин правшей). Движения глаз регистрировали с помощью электроокулографии (ЭОГ). На группе больных проводили дополнительное обследование с помощью МРТ-методов. МРТ-исследования проводились на МР томографе Achieva Philips (Голландия), с напряженностью магнитного поля 3.0 Тесла. Т1-взвешенное сканирование проводилось с покрытием всей головы.

Результаты и обсуждение. Исследование выявило существенные различия между здоровыми испытуемыми и больными в количестве ошибочных ответов и величине латентного периода (ЛП) саккадических реакций в зависимости от пространственного расположения стимулов.

У больных с ультравысоким риском развития шизофрении обнаружено увеличение числа ошибочных саккад на тормозный стимул (ошибка «ложная тревога») на 17±5 мс по сравнению со здоровыми испытуемыми (46±7% ошибок у больных и 30±5 мс — у здоровых, $p<0,005$).

В группе больных показано уменьшение величины ЛП правильных саккад на целевые стимулы по сравнению с группой здоровых (209±76 и 251±72 мс, соответственно, $p<0,0001$). Возможно, что природа уменьшения ЛП саккад при ультравысоком риске развития шизофрении, также как и при шизофрении, обусловлена нарушениями процессов «сенсорной фильтрации», сокращением периода сенсорной обработки и нарушениями процессов произвольного эндогенного внимания за счет снижения «top down» контроля в сторону дорзолатеральной фронтальной коры [1–3].

Установлены различия в пространственной асимметрии величины ЛП правильных и ошибочных саккад в группах больных и нормы. У большинства здоровых испытуемых наблюдалось уменьшение средней величины ЛП правильной саккады вправо по сравнению с саккадой влево (на 10±8 мс, $p<0,05$).

У больных с ультравысоким риском развития шизофрении, наоборот, наблюдалось уменьшение величины ЛП правильных саккад влево (на 16±11 мс, $p<0,001$). Возможно, обнаруженные различия могут быть связаны с нарушениями пространственного внимания и ослаблением тормозного контроля как результат дисфункции правой фронтальной области коры, который был показан при шизофрении [4].

МРТ-исследование установило, что уменьшение величины ЛП саккад на «go» стимул у больных в парадигме «go/no go» коррелирует с увеличением объема серого вещества фронтальной, теменной и височной коры, что возможно отражает компенсаторные механизмы в доманифестационный период развития шизофрении. Использование метода диффузионно-взвешенной томографии выявило снижение показателя фракционной анизотропии височной части правого верхнего продольного пучка у больных ($p<0,001$; $rs=-0,96$). Эти данные могут свидетельствовать о микроструктурной патологии фронто-теменных сетей внимания и глазодвигательного контроля, что может лежать в основе найденных нейрофизиологических различий, отражающих снижение сенсорной переработки, внимания и нарушение тормозного контроля у больных с ультравысоким риском развития шизофрении.

Заключение. Таким образом, результаты исследования показали изменения функциональных и структурных характеристик обеспечения окуломоторного поведения у больных с ультравысоким риском развития шизофрении в парадигме «go/no go». Сопоставление результатов исследования с данными литературы показало сходство в характере саккадических ответов у больных с ультравысоким риском развития шизофрении и у больных шизофренией. Этот факт позволяет предположить, что нейрофизиологические нарушения механизмов когнитивного контроля целенаправленного поведения имеют место на доманифестационном этапе развития шизофрении.

Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ № 14-04-01634.

Литература

1. *Lijffijt M., Lane S. D., Maiera S. L. et al.* LP50, N100, and P200 sensory gating: Relationships with behavioral ibhibition,

attention, and working mamory // Psychophysiology.— 2009.— Vol. 46, № 5.— P. 1059–1072.
2. Enhanced facilitation of spatial attention in schizophrenia / Spencer K. M., Nestor P. G., Valdman O., Niznikiewicz M. A., Shenton M. E., McCarley R. W. // Neuropsychology. 2011.— Vol. 25, № 1., P. 76–85.
3. *Strelets V., Faber P. L., Golikova J.* Chronic schizophrenics have shortened EEG microstate durations // Clini. Neurophysiol.— 2003.— Vol. 114, № 11.— P. 2043–2051.
4. *Moran M. J., Thaker G. K.* Covert visual attention in shizophrenia spectrum personality disorded subjects: visuaspatial cuing and alerting effects // J. of Psychiatric Res.— 1996.— Vol. 30, № 4.— P. 261–275.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НОВОЙ МУТАЦИИ В ГЕНЕ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ KLF11, ВЫЗЫВАЮЩЕЙ ДИАБЕТ MODY

[1]*Т. С. Краснова*, [1]*А. С. Орехова*, [2]*Н. А. Зубкова*, [2]*А. Н. Тюльпаков*, [1]*П. М. Рубцов*
[1]Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия
[2]Эндокринологический научный центр Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

tkrasnova24@mail.ru

Введение. MODY (maturity onset diabetes of the young) — сахарный диабет взрослого типа у молодых, представляющий собой гетерогенную группу наследственных заболеваний, обусловленных дефектами в функционировании β-клеток поджелудочной железы и характеризующихся аутосомно-доминантным типом наследования [1]. Изучение моногенных форм диабета имеет большое значение для выяснения генетических основ развития такого многофакторного заболевания, как сахарный диабет 2 типа. На данный момент выделяют 13 форм MODY, которые обусловлены мутациями в различных генах. В настоящей работе идентифицирована новая мутация в гене транскрипционного фактора KLF11. Данный фактор транскрипции участвует в регуляции инсулинового промотора в β-клетках поджелудочной железы, но для функционирования KLF11 необходимо наличие дополнительных факторов — p300 и PDX-1. Фактор p300 является коактиватором и одновременно связующим звеном между KLF11 и PDX-1, т. к. прямого взаимодействия между этими белками не обнаружено [2]. У пациентов с MODY7 ранее была найдена мутация Ala347Ser, изменяющая активность транскрипционного фактора KLF11 [3]. Данная мутация затрагивает эволюционно консервативный домен TRD3, участвующий в различных белок-белковых взаимодействиях. Мутация Ala347Ser влияет на метаболизм клетки, и может являться причиной уменьшения секреции инсулина [4]. В ходе секвенирования генома у больного с симптомами MODY была обнаружена новая мутация c.1231 A → G (Asn357Ser) в гене транскрипционного фактора KLF11. Эта мутация, по данным биоинформатического анализа, может влиять на сплайсинг пре-мРНК.

Цель исследования: охарактеризовать новую мутацию c.1231 A → G (Asn357Ser) в гене транскрипционного фактора KLF11.

Материалы и методы. Для проверки влияния новой мутации на сплайсинг пре-мРНК нами был сконструирован миниген KLF11, содержащий 3-й и 4-й экзоны и расположенный между ними 3-й интрон. При этом, в 3-й экзон с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза была введена замена c.1231 A → G. Далее с использованием системы временной экспрессии минигена KLF11 в клетках HEK293 мы проанализировали влияние замены c.1231 A → G на сплайсинг пре-мРНК. Поскольку обнаруженная мутация приводит также к замене аминокислоты в домене TRD3, следующей задачей было оценить влияние мутации на взаимодействие KLF11 с другими белками. Для этого нами были получены конструкции, содержащие кДНК KLF11 дикого типа (pcDNA3.1-KLFwt), с известной мутацией Ala347Ser, описанной в литературе (pcDNA3.1-KLF347), с новой мутацией Asn357Ser (pcDNA3.1-KLF357), а также содержащие ДНК инсулинового промотора, встроенную в вектор pGL3-basic и кДНК белков-партнеров KLF11 — pcDNA3.1-PDX-1 и pCMV-p300.

Результаты и их обсуждение. Нами было показано, что замена, обнаруженная у пациента, не приводит к появлению продуктов сплайсинга пре-мРНК, отличных от дикого типа. После котрансфекции клеток HEK293 плазмидой, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем инсулинового промотора, и разными комбинациями плазмид, обеспечивающих экспрессию белков p300, PDX-1, KLF11 и его мутантных вариантов, мы установили, что инсулиновый промотор проявляет активность в клетках HEK293. Каждый из исследованных факторов транскрипции по отдельности незначительно повышает уровень экспрессии гена люциферазы. При одновременной экспрессии p300 и KLF11, как дикого типа, так и мутантных вариантов Ala347Ser или Asn357Ser, увеличение активности промотора было несколько выше. Использование KLF11 или его мутантных вариантов в комбинации с p300 и PDX-1 значительно повышало активность инсулинового промотора.

Заключение. Мы подтвердили данные об активации инсулинового промотора в клетках HEK293 под действием KLF11 в комбинации с p300 и PDX-1. Однако различий в активности промотора в присутствии KLF11 дикого типа и двух мутантных вариантов мы не выявили. Таким образом, вопрос о возможной роли мутации Asn357Ser в раз-

витии MODY остается открытым. Для его решения необходимо использование других клеточных систем.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-34-00930).

Литература

1. *Bell J., Wainscoat J.* Maturity onset diabetes of the young is not linked to the insulin gene // Br. Med. J.— 1983.— Vol. 286, № February.— P. 590–592.
2. *Perakakis N., Danassi D., Alt M. et al.* Human Krüppel-like factor 11 differentially regulates human insulin promoter activity in β-cells and non-β-cells via p300 and PDX1 through the regulatory sites A3 and CACCC box // Mol. Cell. Endocrinol.— 2012.— Vol. 363, №№ 1–2.— P. 20–26.
3. *Neve B., Fernandez-Zapico M., Ashkenazi-Katalan V. et al.* Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function // Proc. Natl Acad. Sci. USA.— 2005.— Vol. 102, № 13.— P. 4807–4812.
4. *Lomberk G., Grzenda A., Mathison A. et al.* Krüppel-like factor 11 regulates the expression of metabolic genes via an evolutionarily conserved protein interaction domain functionally disrupted in maturity onset diabetes of the young // J. Biol. Chem.— 2013.— Vol. 288, № 24.— P. 17745–17758.

РОЛЬ НЕЙРОКИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ И ФЕРМЕНТОВ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ТАБАЧНЫМ ДЫМОМ

Ю. Б. Лепейко, И. В. Дюйзен

Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

mail@tgmu.ru

Введение. Известно, что стимуляция сенсорных нервных волокон и высвобождение пептидных медиаторов может приводить к развитию нейрогенного воспаления в периферических тканях [1, 2]. Индуцированные нейрональным влиянием функциональные сдвиги зачастую поддерживаются локальными исполнительными системами протеолитических ферментов межклеточного матрикса, за счет чего развиваются и поддерживаются процессы структурной реорганизации тканей и органов, определяя хроническое течение заболевания [3, 4].

Цель нашего исследования — показать возможную роль инициаторов нейрогенного воспаления и матриксных металлопротеиназ в развитии патологических изменений слизистой оболочки носа при экспериментальном хроническом табакокурении.

Материалы и методы. В соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» животным (крысы — самцы, Вистар, массой 320±20 г, N25, группа «курильщики») формировали модель хронического табакокурения путем дозированной подачи табачного дыма в специализированные камеры в течение 9 мес. (по одной пачке сигарет ежедневно). Контролем служили интактные животные (N20). Локализацию и уровень активности SP, NK1, MMP9 и TIMP2 в тканях слизистой оболочки полости носа определяли методом иммуногистохимии. Оценивали удельную плотность распределения иммуно-преципитата (в % от общей площади и удельную плотность распределения клеток в расчете на 1 мм^3 ткани).

Результаты исследования. Экспрессия SP (вещество P) слизистой оболочки носа интактных животных определяется в нервных волокнах и клеточных элементах (фибробласты, гистиоциты), собственной пластинке и подслизистой основы, а также — в клетках мерцательного эпителия. У крыс-«курильщиков» синтез SP увеличивается во всех слоях слизистой оболочки, наиболее выраженно — в подслизистой основе. При этом пропорционально возрастает и число клеток, экспрессирующих NK1(нейрокининовые) рецепторы. При этом более чем в 2 раза возрастает число тучных клеток, несущих на поверхности NK1-R.

Локализация MMP9 (матриксальная металлопротеиназа 9) в слизистой оболочке носа интактных крыс обнаруживается в соединительнотканных слоях и в цитоплазме тучных клеток собственной пластинки. При табачной интоксикации взрастает активность и площадь локализации межклеточного фермента, обнаруживается его содержание в эндотелиальных клетках микроциркуляторного русла, а также значительно возрастает число MMP9-секретирующих тучных клеток. Изменение активности тканевого ингибитора металлопротеиназ (TIMP2) демонстрирует при длительной экспозиции табачного дыма противоположную динамику — во всех слоях слизистой оболочки заметно уменьшается площадь TIMP2-иммунопозитивной зоны.

Заключение и выводы. Таким образом, длительная экспозиция табачного дыма приводит к изменению активности всех исследованных маркеров. SP (нейронального и не-нейронального происхождения) и его рецепторы могут быть вовлечены в развитие функциональных изменений за счет регуляции секреторной активности желез, уровня локальной гемодинамики, выраженности воспалительных процессов и активации патологических рефлексов [2, 5]. Усиление содержания MMP9 во всех слоях слизистой оболочки (на фоне снижения активности ее эндогенного ингибитора TIMP2), а также экс-

прессия фермента эндотелиальными клетками сосудов могут создавать предпосылки для изменения свойств межклеточного матрикса, нарушения взаимодействия клеток, способствовать развитию склеротических процессов и нарушать целостность сосудистой стенки [4, 6]. Дополнительная активация местных иммунных клеток (увеличение общего числа и активности NK1-R и MMP9 в тучных клетках) свидетельствуют о присоединении асептического нейрогенного воспаления [1]. В совокупности эти процессы могут определять развитие морфологических перестроек тканей слизистой оболочки носа, наблюдаемых у экспериментальных животных.

Литература

1. Role of the tachykinin NK1 receptor in a murine model of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation / Swert K. O De, Bracke K. R., Demoor T., Brusselle G. G., Joos G. F. // Respiratory Research.— 2009.— Vol. 1.— P. 10–37.
2. Sputum substance P and neurokinin A are reduced during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease / Boschetto P., Miotto D., Bononi I., Faggian D., Plebani M., Papi A., Creminon C., Rosa E. De, Fabbri L. M., Mapp C. E. // Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.— 2005.— Vol. 18.— P. 199–205.
3. *Шойхет Я. Н.* Роль матриксных металлопротеиназ при воспалительных заболевания легких // Проблемы клинич. медицины.— 2008.— № 3.— С. 99–101.
4. *Ziora D., Dworniczak S, Kozielski J.* Induced sputum metalloproteinases and their inhibitors in relation to exhaled nitrogen oxide and sputum nitric oxides and other inflammatory cytokines in patients with chronic obstructive pulmonary disease // J Physiol Pharmacol.— 2008.— Vol. 59, № 6.— P. 809–817.
5. The triple neurokinin-receptor antagonist CS-003 inhibits neurokinin A-induced bronchoconstriction in patients with asthma / Schelfhout V., Louis R., Lenz W., Heyrman R., Pauwels R., Joos G. // Pulm Pharmacol Ther.— 2006.— Vol. 19.— P. 413–418.
6. *Can I. H.* The expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, and TIMP-1 in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis // Otolaryngol Head Neck Surg.— 2008.— Vol. 139, № 2.— P. 211–215.

СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ НЕОНАТАЛЬНОЙ ГОНАДЫ МЫШИ СОХРАНЯЮТ СПОСОБНОСТЬ К ОБРАЗОВАНИЮ СЕМЕННЫХ КАНАЛЬЦЕВ ПОСЛЕ КРАТКОВРЕМЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Е. А. Малолина

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия

kate.ma85@gmail.com

В последнее время, в связи с повышением частоты случаев мужского бесплодия и недостаточной эффективностью традиционных методов его лечения, активно обсуждаются методы клеточной терапии мужского бесплодия [1]. Один из наиболее актуальных подходов предполагает дифференцировку эмбриональных или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в мужские гаметы в условиях культуры (сперматогенез *in vitro*). Помимо возможного применения в медицинской практике, данный подход можно использовать для детального изучения процесса дифференцировки мужских половых клеток и поиска способов репарации его дефектов, являющихся одной из причин бесплодия. Однако согласно данным последних работ [2, 3], для эффективного прохождения сперматогенеза *in vitro* половые клетки необходимо культивировать совместно с соматическими клетками неонатальной гонады, причем соматические клетки образуют вокруг половых структуры, напоминающие семенные канальцы, в которых в норме и идет развитие половых клеток. Низкая доступность и ограниченный объем клеточного материала, который может быть получен из неонатальной гонады, являются лимитирующими факторами для дальнейшего развития этого подхода. В настоящей работе с целью преодоления этих ограничений изучена возможность формирования семенных канальцев из соматических клеток неонатального семенника мыши, предварительно размноженных в культуре.

Для этого из семенников 4–6-суточных мышей линии C57Bl/6, согласно общепринятым методикам, выделяли соматические клетки Сертоли (КС) и перитубулярные мышечные клетки (ПМК). КС непосредственно контактируют с половыми клетками, поддерживая их развитие, и составляют, совместно с ПМК, основу структуры семенного канальца. Клетки культивировали в условиях 2D: КС — на бессывороточной среде с 15% KSR (заменитель сыворотки) при 34° С, ПМК — на среде с 10% сыворотки FBS при 37° С. Идентификацию клеток в культуре проводили с помощью иммунофлуоресцентной окраски на маркер КС Wt1 (клон C-19; sc-192; Santa Cruz, США) и маркер ПМК — альфа-мышечный актин (ab5694; Abcam, Великобритания). На 3, 6, 9, 12 и 15 сут культивирования КС и ПМК смешивали и помещали в коллагеновый гель. На 7 сут культивирования в 3D условиях анализировали культуры с помощью иммунофлуоресценции (конфокальная микроскопия) и ПЦР.

Было установлено, что КС и ПМК, размножавшиеся в течение 3 и 6 сут в 2D культуре, при помещении в 3D условия формируют многочисленные канальце-подобные структуры, соединенные друг с другом в сложную сеть, и практически не отличаются от контроля — соматических клеток, помещенных в коллагеновый гель без предварительного 2D культивирования. Клетки, поддерживавшиеся в 2D культуре 9 и 12 сут, по-прежнему способ-

ны формировать канальцы, однако число канальцев резко снижается. Клетки, культивировавшиеся в 2D 15 сут, не образуют упорядоченных структур в коллагеновом геле.

По данным ПЦР, КС при 2D- и 3D-культивировании сохраняют экспрессию своих основных маркеров, таких как Sox9, Wt1, Dmrt1, Gata4, Sf1, однако к 12–15 сут 2D-культивирования экспрессия всех проанализированных маркеров значительно снижается, что свидетельствует о постепенной потере соматическими клетками семенников своих свойств в условиях культуры. По-видимому, с этим и связано снижение морфогенетических способностей КС после 9–12 сут 2D-культивирования.

Полученные результаты позволяют заключить, что соматические клетки неонатальной мужской гонады можно размножать в кратковременной культуре без потери ими способности образовывать канальце-подобные структуры.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00664мол_а.

Литература

1. *Aponte P. M., Schlatt S., Franca L. R.* Biotechnological approaches to the treatment of aspermatogenic men // Clinics (Sao Paulo).— 2013.— Vol. 68, Suppl. 1.— P. 157–167.
2. Complete meiosis from embryonic stem cell-derived germ cells in vitro / Zhou Q., Wang M., Yuan Y., Wang X., Fu R., Wan H., Xie M., Liu M., Guo X., Zheng Y., Feng G., Shi Q., Zhao X. Y., Sha J., Zhou Q. // Cell Stem Cell.— 2016.— Vol. 18 (3).— P. 330–340.
3. *Saitou M., Miyauchi H.* Gametogenesis from pluripotent stem cells // Cell Stem Cell.— 2016.— Vol. 18 (6).— P. 721–735.

РОЛЬ D1-РЕЦЕПТОРОВ ДОФАМИНА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ПОМК В АРКУТНОМ ЯДРЕ ГИПОТАЛАМУСА

А. Л. Михрина, Е. В. Михайлова

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

nastya_mihrina@mail.ru

Введение. Про-опиомеланокортин (ПОМК) — является молекулой, из которой образуется меланокортиновые пептиды (альфа-, бета-, гамма-MSH, АКТГ). Действие этих пептидов реализуется через G-белок-зависимые активирующие цАМФ меланокортиновые рецепторы пяти типов (МКР1–5) и регулируется эндогенными антагонистами МКР [1]. У млекопитающих в головном мозге центральная меланокортиновая система представлена двумя популяциями нейронов аркуатного ядра гипоталамуса (АРК), экспрессирующими ПОМК или agouti gene related protein (AgRP) — эндогенный антагонист МКР3 и МКР4, участвующие в регуляции пищевого поведения [2]. Данные, полученные различными авторами, а также в нашей лаборатории [3, 4] демонстрируют локализацию ПОМК- и AGRP-иммунопозитивных отростков вокруг дофаминергических нейронов в АРК, а также и в среднем мозге, где располагается самая большая популяция дофаминергических нейронов. На дофаминергических нейронах АРК и среднего мозга выявлены МКР3 и МКР4, что свидетельствует об участии меланокортиновой системы в регуляции биосинтеза дофамина в этих структурах. Ранее мы показали присутствие $Д_1$-рецепторов дофамина непосредственно на телах ПОМК-иммунопозитивных нейронов (*не опубликованные данные*).

Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы выяснить роль $Д_1$-рецепторов дофамина в регуляции экспрессии ПОМК.

Материалы и методы. Исследование проведено на половозрелых самцах крысы породы Вистар (200–220 г). В течение 3 дней крысы (n=9) внутрибрюшинно получали по одной инъекции (400 мкл) селективного антагониста $Д_1$-рецепторов дофамина (SCH 39166, Tocris, Швейцария) в дозе 0,3 мг/кг или 400 мкл физиологического раствора (контрольная группа). Через 1 ч после последней инъекции крыс наркотизировали хлорал гидратом, мозг перфузировали транскардиально и обрабатывали для морфологических исследований (методика подробно ранее описана) [3, 4]. Фронтальные срезы из области АРК (20 мкм), полученные с помощью критома (Leika, Германия), монтировали на стекла superFrost/plus и использовали для иммуногистохимических исследований с помощью биотин-стрептавидинового метода [4]. Для инкубации использовали первичные антитела мыши против ПОМК (Abcam, Великобритания, в разведении 1:1000), вторичные антитела козы против мыши, конъюгированные с биотином (VectorLab, Великобритания, 1:500), стрептавидин-пероксидазу (Sigma, США, 1:700), реакцию визуализировали с помощью диаминобензидина. Микрофографии из области АРК получали с помощью микроскопа KarlZeiss (Axio Imager) в формате jpg, которые анализировали в программе Фото-М. Статистический анализ проводили с помощью непарного t-критерия Стьюдента ($p<0,05$), результаты представлены в условных единицах как среднее арифметическое оптической плотности в контроле и опыте ± среднее квадратичное отклонение и как процент изменения по сравнению с контрольным уровнем.

Результаты. Количественный анализ свидетельствует об увеличении на 35% ($p<0,05$) оптической плотности ПОМК после введения блокатора $Д_1$-рецепторов дофамина (0,23±0,02 по сравнению с 0,17±0,01 условных единиц) в нейронах АРК. Известно, что $Д_1$-рецепторы дофамина являются активирующими, через них дофамина влияет на активацию аденилатциклазы [5]. Однако их блокада вызвала не уменьшение, а увеличение уровня ПОМК в нашем эксперименте, что, по-видимому, является результатом интегративных взаимодействий между нейронами

различных ергичностей в АРК, так как $Д_1$-рецепторы и в других типах нейронов, в частности в ГАМК-ергических.

Заключение. Полученные нами данные демонстрируют, что недостаток дофамина (блокада $Д_1$-рецепторов) приводит к увеличению уровня ПОМК и, соответственно, активирующих влияний на сами дофаминергические нейроны, что может являться компенсаторным механизмом, который реализуется при дисфункции дофаминергической системы мозга.

Исследование проведено при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-15-10388.

Литература

1. *Cone R. D.* Anatomy and regulation of the central melanocortin system // Nat. Neurosci.— 2005.— Vol. 8, № 5.— P. 571–578.
2. Anatomy of an Endogenous Antagonist: Relationship between Agouti-Related Protein and Proopiomelanocortin in Brain / Bagnol D., Lu X. Y., Kaelin C. B., Day H. E., Ollmann M., Gantz I., Akil H., Barsh G. S., Watson S. J. // J. Neurosci.— 1999.— Vol. 19.— P. 1–7.
3. *Михрина А. Л., Романова И. В.* Роль AGRP в регуляции дофаминергических нейронов мозга // Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.— 2013.— Т. 99, № 9. –С. 1036–1044.
4. *Романова И. В., Михрина А. Л.* Участие агути-подобного белка в механизмах регуляции цикла бодрствование-сон // Физиология человека.— 2013.— Т. 39, № 6.— С. 24–30.
5. *Beaulieu J.-M., Gainetdinov R. R.* The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors // Pharmacol Rev.— 2011.— Vol. 63.— P. 182–217.

ИНГИБИРОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА ХОЛЕСТЕРИНА КАК ТАРГЕТНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ SHH-ОПОСРЕДОВАННЫХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

[1,2]Р. Э. Мурадимова, [1]З. И. Абрамова
[1]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Россия
[2]FoxChaseCancerCenter, Philadelphia, PA, USA

Renata.Muradimova@gmail.com

Сигнальный путь SonicHedgehog (Shh) является ключевым регулятором пролиферации и дифференцировки клеток в ходе эмбриогенеза. Чрезмерная активация данного сигнального каскада является причиной развития многочисленных онкологических заболеваний: медуллобластомы (МБ), базальной клеточной карциномы, глиомы, рака поджелудочной и предстательной желез [1]. Методы традиционного лечения включают комбинацию методов онкохирургии, облучения и химиотерапии [2]. Применяемая при лечении онкологических заболеваний химиотерапия направлена на подавление пролиферации клеток опухоли, однако ввиду отсутствия специфичности действия, также приводит к поражению здоровых клеток, что является основной причиной развития побочных эффектов.

МБ является наиболее распространенной эмбриональной опухолью головного мозга, поражающей преимущественно новорожденных и детей в возрасте до 14 лет. МБ развивается в мозжечке, однако может метастазировать с потоками цереброспинальной жидкости в пределах центральной нервной системы. Ранее было показано, что активация сигнального пути Shh в клетках гранулярных нейрональных предшественников мозжечка [3–4] приводит к развитию МБ. Несмотря на значительные успехи, сделанные в области изучения молекулярно-генетических механизмов развития и лечения МБ, пятилетняя выживаемость для больных МБ колеблется от 35 до 65%, а выжившие пациенты подвержены развитию тяжелых нейрокогнитивных и нейроэндокринных расстройств [5]. Таким образом существует острая потребность в выявлении новых онко-мишеней, а также в дизайне менее токсичных лекарственных препаратов.

Существующие методы лечения МБ блокируют сигнальный путь Shh посредством ингибирования его эффектора — трансмембранного белка Smoothened (Smo). Такой подход является проблематичным, так как высокие дозы, необходимые для регрессии опухоли, приводят к развитию серьезных побочных эффектов и устойчивости к ингибиторам Smo. Недавние исследования показали, что необходимым условием активации Smo является присоединение холестерина к его внутриклеточному домену [6].

Нами было показано, что холестерин, синтезированный клетками МБ, необходим для функционирования Shh-пути. Ингибирование Shh-пути посредством холестеринового дефицита, как генетически, так и медикаментозно, приводит к резкому снижению пролиферации опухолевых клеток и снижению роста аллотрансплантата. Данная стратегия является многообещающим подходом для таргетной терапии МБ наряду с другими Shh-опосредованными онкологическими заболеваниями.

Литература

1. *Rubin L. L., de Sauvage F. J.* Targeting the Hedgehog pathway in cancer // Nature Reviews Drug Discovery.— 2006.— Vol. 12.— P. 1026–1033.
2. Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma / Packer R. J., Gajjar A. J., Vezina G., Rorke-Adams L., Burger P. C., Robertson P. L. et al. // Journal of Clinical Oncology.— 2006.— Vol. 24.— P. 4202–4208.
3. Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells / Yang Z. J., Ellis T., Markant S. L., Read T. A., Kessler J. D., Bourboulas M., et al. // Cancer Cell.— 2008.— Vol. 14.— P. 135–145.

4. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins / Gibson P., Yong T., Robinson G., Thompson M. C., Currle D. S., Eden C., et al. // Nature.— 2010.— Vol. 468.— P. 1095–1099.
5. Neurocognitive consequences of risk-adapted therapy for childhood medulloblastoma / Mulhern R. K., Palmer S. L., Merchant T. E., Wallace D., Kocak M., Brouwers P., et al. // Journal of Clinical Oncology.— 2005.— Vol. 24.— P. 5511–5519.
6. Hedgehog pathway modulation by multiple lipid binding sites on the smoothened effector of signal response / Myers B. R., Sever N., Chong Y. C., Kim J., Belani J. D., Ruchnovsky S., et al. // Developmental Cell.— 2013.— Vol. 26 — P. 347–356.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СУЛЬФАКРИЛАТА И СПИРТА ЭТИЛОВОГО НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ НЕПАРАЗИТАРНОЙ КИСТЫ ПЕЧЕНИ

Л. Ф. Муфазалова, Н. А. Муфазалова, А. Д. Марон, К. В. Батракова, В. А. Шевчук, А. Э. Султанова
Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

mufazalovanatalya@yandex.ru

Введение. Хорошо известно, что нейтрофилы — это клетки, которые не только осуществляют функцию первой линии защиты организма, но активно участвуют в регуляции иммунного, воспалительного ответов, кроветворения, противоопухолевой и антимикробной защиты, влияют на систему нейроэндокринной регуляции гомеостаза, а также на процессы репаративной регенерации печени [1, 2]. Следовательно, немаловажным является вопрос влияния склерозантов, применяемых при лечении непаразитарных кист органов брюшной полости, на функциональное состояние этих клеток. В качестве склерозирующих веществ наиболее часто применяются спирт, глицерин, полидоканол и др. [3–5]. В связи с этим целью исследования явилось сравнительное изучение влияния склерозантов — спирта этилового (СпЭ) и сульфакрилата (Сфк) — на активность полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) у животных с экспериментальными непаразитарными кистами печени.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 80 белых неинбредных половозрелых белых крысах массой 180–220 г, содержавшихся в стандартных условиях вивария. Для формирования кисты в ткань печени имплантировали полихлорвиниловое инородное тело (сроком на 30 дней) с последующим его удалением. Животные были разделены на 4 группы: 1 группа — контроль (интактные животные), 2 группа — животные со сформированной кистой, 3 и 4 группы — животные со сформированной кистой, получавшие в полость кисты СпЭ и Сфк соответственно.

Определяли количество лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов в периферической крови, интенсивность кислородзависимого метаболизма (спонтанный и индуцированный НСТ-тест), поглотительную способность, антимикробную активность (в отношении грибов Candida albicans) в условиях функционирования и блокады (азидом натрия) оксидантных микробицидных систем, активность миелопероксидазы (МП) и содержание катионных белков (КБ) в ПМЯЛ [6].

Результаты регистрировали на 60 и 90 сутки от момента формирования кисты. Статистическую обработку данных проводили с использованием методов вариационной статистики [7], достоверными считали различия при уровне $p \leqslant 0{,}05$. Данные представлены в процентах к контролю.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что формирование непаразитарной кисты в печени приводило к количественным и качественным нарушениям нейтрофильного звена: наблюдалось нарастание лейкоцитоза, угнетение как оксидантных, так и неоксидантных механизмов киллинга, снижение активности миелопероксидазы, уровня катионных белков, нарушения кислородзависимого метаболизма клеток и их поглотительной способности.

Применение СпЭ уменьшало выраженность лейкоцитоза (количество лейкоцитов снизилось со 147,71% до 125,91%) за счет снижения до нормы уровня нейтрофилов при сохранении лимфоцитоза. Восстанавливалась активность как кислородзависимых, так и кислороднезависимых факторов микробицидности (индекс инактивации (ИИ) составил — 91,67% и 84,13% соответственно), что цитохимически подтверждалось повышением до уровня интактных животных активности МП и уровня КБ. Однако сохранялось вызванное кистозным процессом подавление поглотительной способности ПМЯЛ: оставалось сниженным и число ПМЯЛ, участвующих в фагоцитозе, и их поглотительная активность (до 77,50% и 71,84% соответственно).

Использование в качестве склерозанта Сфк полностью устраняло лейкоцитоз за счет равномерного снижения, как нейтрофилов, так и лимфоцитов. При этом Сфк не только восстанавливал, но и активировал оксидантные и неоксидантные микробицидные системы ПМЯЛ (ИИ составил 122,38% и 130,49% соответственно). Это сопровождалось повышением активности МП и уровня КБ в ПМЯЛ. Сфк нормализовал как кислородзависимый метаболизм ПМЯЛ, так и их поглотительную активность.

Выводы. Таким образом, можно заключить, что Сфк более эффективно, чем СпЭ, устраняет негативное воздействие кистозного процесса в печени на функциональное состояние ПМЯЛ, оказывая при этом активирующее влияние на оксидантные и неоксидантные механизмы киллинга ПМЯЛ и поглотительную способность этих клеток.

Литература

1. *Долгушин И. И., Андреева Ю. С., Савочкина А. Ю.* Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов.— М.: Изд-во РАМН, 2009.— 208 с.
2. *Ковальчук Л. В., Хорева М. В., Никонова А. С.* Распознающие рецепторы врожденного иммунитета (NLR, RLR и CLR) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.— 2011.— № 1.— С. 93–100.
3. Hepatic cysts treated with percutaneous ethanol sclerotherapy: time to extend the indications to haemorrhagiccysts and polycystic liver disease / Benzimra J., Ronot M., Fuks D., Abdel-Rehim M., Sibert A., Farges O., Vilgrain V. // Eur Radiol.— 2014.— Vol. 24 (5).— P. 1030–1038. doi: 10.1007/s00330-014-3117-x.
4. Percutaneous sclerotherapy of liver and renal cysts, comments on the EFSUMB guidelines / Dietrich C. F., Chiorean L., Potthoff A., Ignee A., Cui X., Sparchez Z. // Z Gastroenterol.— 2016.— Vol. 54 (2).— P. 155–166. doi: 10.1055/s-0041-106594.
5. Percutaneous treatment of symptomatic non-parasitic hepatic cysts. Initial experience with single-session sclerotherapy with polidocanol / Spârchez Z., Radu1 P., Zaharie1 F., Al Hajjar1 N., Spârchez M. // Med Ultrason.— 2014.— Vol. 16, № 3.— P. 222–228.— DOI: 10.11152/mu.2013.2066.163.2pr
6. *Ягода А. В.* Клиническая цитохимия / Под ред. А. В. Ягоды, Н. А. Локтева.— Ставрополь, 2005.— 485 с.
7. *Гареев Е. М.* Основы математико-статистической обработки медико-биологической информации.— Уфа: Изд-во ГОУ ВПО «Башгосмедуниверситет Роздрава».— 2009.— 346 с.

ВЛИЯНИЕ СУТОЧНЫХ БИОРИТМОВ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГОМЕОСТАЗ ШКОЛЬНИКОВ

М. С. Нечаева, Е. С. Токарева, П. П. Архипенко, Я. В. Булгакова, Е. В. Дорохов
Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко, Россия

nechaevams@rambler.ru

Способность синхронизировать эндогенные функции с динамикой внешних условий является одним из критериев, определяющих динамическое равновесие и процессы адаптации в биологических системах. Она передается по наследству и свойственна всем живым организмам. В настоящее время известно более 50-ти функций, имеющих суточную периодичность. Динамика этих околосуточных показателей биоритмов определяет хронотип человека. С ним связаны не только колебания уровня метаболических процессов, но и показатели работоспособности в разное время суток, определенные черты характера и показатели качества жизни. По стереотипу чередования активности и пассивности в течение суток большинство людей могут быть отнесены к двум базовым хронотипам: «жаворонкам» и «совам» [1]. «Жаворонкам» свойственен ранний утренний подъем, ранний отход ко сну и высокая работоспособность в первой половине дня [2]. У «сов» наблюдается противоположная картина. «Голуби» занимают промежуточное положение между «совами» и «жаворонками», но в целом, всё же ближе к лицам утреннего типа [2].

Рядом авторов было показано, что физиологическое состояние человека способно оказывать влияние на его генетический аппарат [3, 4]. Учитывая, что параметры физиологического состояния в значительной мере зависят от принадлежности к хронотипу, целью нашего исследования явилось определение влияния околосуточных биологических ритмов на частоту встречаемости аномалий ядра в клетках буккального эпителия человека.

Материалы и методы исследования. В качестве испытуемых были выбраны 30 учеников 9 класса лицея № 1 г. Воронежа (10 из них обладали хронотипом «жаворонок», 10 — «голубь», 10 — «сова»). После определения принадлежности к хронотипу (опросник Хорна-Остберга) [5], оценивали состояние их генетического гомеостаза при помощи микроядерного теста в буккальном эпителии, который широко используется для определения влияния различных факторов на генетическую стабильность организма [3, 4].

Сбор материала, изготовление препаратов и окраску их азур-эозином по Романовскому-Гимза осуществляли по описанной ранее методике [3, 4]. На каждом препарате просматривали не менее 2000 клеток, среди которых определяли количество клеток с различными аберрациями ядра (микроядро, протрузия, перинуклеарная вакуоль, насечка, двойное ядро, кариолизис, кариорексис, кариопикноз) [4].

Протокол обследования включал вычисление частоты встречаемости клеток с каждым типом нарушений, как отношение числа клеток с той или иной аберрацией к общему числу проанализированных клеток (в ‰), частоту аберраций всех типов, как отношение суммы клеток с нарушениями к общему числу проанализированных клеток (в ‰). Статистическая обработка данных была проведена с помощью пакета статистических программ «Stadia» методом Ван-дер-Вардена, так как распределение частоты встречаемости аберраций ядра не подчиняется нормальному закону. Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе А. П. Кулаичева [6].

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований подтвердили наше предположение о том, что хронотип человека способен оказывать влияние на его генетический гомеостаз. Об этом свидетельствуют достоверные различия в уровне клеток буккального эпителия с патологиями ядра у исследуемых групп. Так у учащихся-«сов» было выявлено больше буккальных эптелиоцитов с микроядрами (8,49±1,16‰), чем у «жаворонков» (4,95±0,47‰) ($P<0,01$). У испытуемых, являющихся «совами», частота встречаемости клеток буккального эпителия с перинуклеарными вакуолями была выше (5,66±0,57‰), чем у «жаво-

ронков» (3,22±0,5‰) и «голубей» (3,33±0,42‰) (P<0,01). Клеток с двумя ядрами у «сов» (1,98±0,4‰) и «жаворонков» (0,92±0,32‰) больше, чем у «голубей» (0,24±0,12‰) (P<0,01). Буккальных эпителиоцитов с кариолизисом было выявлено больше у учащихся «сов»

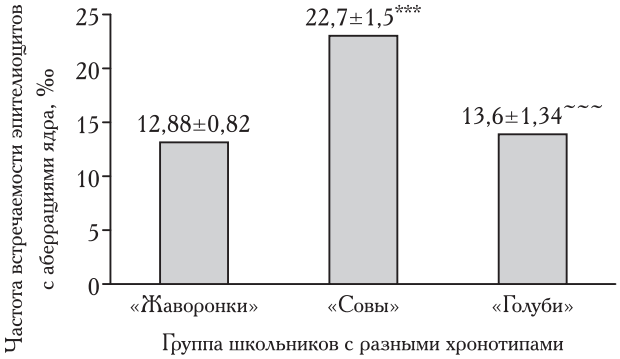


Рисунок. Частота встречаемости буккальных эпителиоцитов с аберрациями ядра у школьников с различными хронотипами. Обозначения: *** — различия с группой «жаворонков» достоверны (P<0,001); ~~~ — различия с группой «сов» достоверны (P<0,001).

(1,24±0,27‰), чем у «жаворонков» (0,34±0,15‰) (P<0,05). Сумма всех ядерных аберраций в клетках буккального эпителия школьников с хронотипом «совы» (22,7±1,5‰) превысила этот показатель у групп школьников с хронотипом «голуби» (13,6±1,34‰) и «жаворонки» (12,88±0,82‰) (P<0,001) (рисунок). Частота встречаемости клеток с аномалиями ядра во всех обследованных группах не выходила за пределы фоновых значений [4].

Выводы. Таким образом, на основании полученных данных, можно сделать вывод, что на стабильность генетического аппарата школьников влияет их принадлежность к определенному хронотипу. Лица, относящиеся к хронотипу «совы», имели больше клеток буккального эпителия с ядерными аномалиями, чем лица, являющиеся «голубями» и «жаворонками».

Литература

1. *Доскин В. А., Лаврентьева Н. А.* Ритмы жизни.— М.: Медицина, 1991.— 176 с.
2. *Мирзоев О. М., Аленова А. В.* Хронобиологические аспекты организации системы подготовки легкоатлетов в спринтерском и барьерном беге // Известия Тульского государственного университета. Физическая культура. Спорт.— 2013.— № 1.— С. 211–220.
3. *Калаев В. Н., Артюхов В. Г., Нечаева М. С.* Микроядерный тест буккального эпителия ротовой полости человека: проблемы, достижения, перспективы // Цитология и генетика.— 2014.— Т. 48, № 6.— С. 62–80.
4. *Калаев В. Н., Нечаева М. С., Калаева Е. А.* Микроядерный тест буккального эпителия ротовой полости человека: монография. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2016.— 136 с.
5. *Эдлунг М.* Время — деньги. М.: Эксмо, 2004.— 352 с.
6. *Кулаичев А. П.* Методы и средства комплексного анализа данных. М.: ФОРУМ: ИНФА, 2006.— 512 с.

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, СИНТЕЗИРУЕМОЙ ШТАММОМ *GLUCONACETOBACTER HANSENII*

И. Ю. Петрухин, А. Г. Демченко, В. В. Каширин
Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Россия
demchenkoann@yandex.ru

Введение. Бактериальная целлюлоза — новый объект в регенеративной медицине, обладающий уникальными свойствами по сравнению с используемыми аналогами, такими, как хитин, хитозан, оксиалканоаты. Она представляет собой природный полисахарид, не содержащий примесей, имеет сетчатую и упорядоченную наноструктуру микрофибрилл, обладает биосовместимостью, эластичностью и гидрофильностью. Бактериальная целлюлоза может быть использована в качестве матрицы для трудно культивируемых клеток эукариот, так как обладает пористой структурой, что способствует прорастанию через нее клеток и сосудов.

Известно, что бактериальную целлюлозу синтезирует небольшое число прокариот, при этом свойства её могут различаться, поэтому их исследования необходимы для оценки возможности их использования в практике. До настоящего времени основные исследования посвящены полимеру бактериальная целлюлоза, синтезируемому продуцентом *G. xylinum*. Известно, что штаммы вида *Gluconacetobacter hansenii* синтезируют не только бактериальную целлюлозу, но и олигомеры глюкуроновой кислоты [1–3]. Однако исследования свойств полимера, синтезируемого штаммами *G. hansenii*, малочисленны.

Целью изучения была оценка цитотоксичности бактериальной целлюлозы, синтезируемой штаммом *G. hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ B-10547) [4].

Материалы и методы. В зависимости от условий культивирования штамма *G. hansenii* бактериальную целлюлозу можно получать в форме пеллет сферической формы (при глубинном культивировании) или пленок (при статическом культивировании). Для получения пленок бактериальной целлюлозы штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 культивировали в стационарных условиях на модифицированной среде *S. Hestrin* и *M. Schramm* [5] следующего состава, г/л: сахароза — 20, пептон — 5, дрожжевой экстракт — 5, Na_2HPO_4 — 2,7, моногидрат лимонной кислоты — 1,15.

Для оценки цитотоксичности бактериальной целлюлозы использовали МТТ-тест по методу Моссмана [6] с применением клеточных линий: эпителий почки зелёной

обезьяны Vero и клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

Клетки эукариот засевали в концентрации 15% от монослоя ($13,5*10^3$-Vero; $9,5*10^3$-MCF-7) на образцы биополимеров в виде круглых мембран с площадью поверхности с одной стороны 0,3 $см^2$, которые были помещены в отдельные лунки 96-ти луночного планшета (Corning, США). Культивирование проводили в полной питательной среде DMEM (Invitrogen, США), содержащей 10%-ю телячью фетальную сыворотку («HyClone Defined», HyClone, США) и 1% пенициллина/стрептомицина (Thermo). Объём культуральной среды в лунках составлял 250 мкл. Культивирование осуществляли в CO_2-инкубаторе с концентрацией CO_2 5%, атмосферного воздуха 95% и с повышенной влажностью.

Подсчет клеток осуществляли в счетчике TC-10 (Bio-Rad) по протоколу производителя. В качестве контроля использовали клетки на пластике.

Результаты и их обсуждение. В результате исследований установлено, что адгезивная и пролиферативная клеточная активность имеет более высокие показатели при культивировании на всех образцах бактериальной целлюлозы, чем в контроле. Однако наибольшая адгезивная и пролиферативная клеточная активность наблюдалась при культивировании на образцах пленок бактериальной целлюлозы, полученных в результате культивирования в течение 7 суток.

Выводы. Таким образом, на основании проведенного анализа результатов МТТ-теста можно сделать заключение, что бактериальная целлюлоза не обладает выраженной цитотоксичностью и может применяться в регенеративной медицине.

Литература

1. *Shah N., Ha J. H., Park J. K.* Effect of reactor surface on production of bacterial cellulose and water soluble oligosaccharides by Gluconacetobacter hansenii PJK // Biotechnol Bioprocess Eng.— 2010.— № 15.— P. 110–8.
2. *Jung J. Y., Khan T., Park J. K., Chang H. N.* Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter hansenii using a novel bioreactor equipped with a spin filter // Korean J Chem Eng.— 2007.— № 24.— P. 265–71.
3. *Khan S., Shezad O., Khan T., Ha J. H., Park J. K.* Production of bacterial cellulose in static conditions by a simple fed-batch cultivation strategy // Korean Chem Eng Res.— 2009.— № 47.— P. 506–11.
4. Патент РФ. 2011. № 2415221. Штаммбактерии Gluconacetobacter hansenii GH-1/2008 — продуцент бактериальной целлюлозы. Авторы Громовых Т. И., Фан Ми Хань, Данильчук Т. Н. Заявка № 2011121841. Опубл. 20.10.2012. Бюлл. № 29.
5. *Hestrin S., Schramann M.* Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum: 2. Preparation of Freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose // Biochemical Journal.— 1952.— № 58.— P. 345–352.
6. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity // Journal of immunological methods.— 1983.— T. 65, № 1–2.— C. 55–63.

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА НА ТЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В СИСТЕМЕ НИЖНЕЙ ПОЛОЙ ВЕНЫ

Ж. М. Пиханова

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

zhanna.pikhanova@yandex.ru

Введение. Хроническая венозная недостаточность (ХВН) нижних конечностей является едва ли не самым распространенным заболеванием среди населения индустриально развитых стран [1]. Среди причин данной патологии варикозная болезнь нижних конечностей (ВБНК) играет немаловажную роль [2]. Как свидетельствуют исследования последних лет, на тяжесть течения болезни могут оказывать влияние компоненты метаболического синдрома (МС) [3, 4].

Цель исследования: оценить влияние компонентов МС на тяжесть течения ХВН нижних конечностей у больных ВБНК.

Материалы и методы. Всего обследовано 70 больных ВБНК, клинические проявления ХВН оценивалась в соответствии с классификацией «CEAP» (clinical, etiologic, anatomic, pathophysiologic) (C_3–C_6), а также по шкале тяжести хронических заболеваний вен «VCSS» (venous clinical severity score). Основную группу составили 35 человек с явлениями МС, который оценивался по критериям Всемирной организации здравоохранения, 1999 г. В контрольную группу вошли 35 пациентов без МС. Обе группы были сопоставимы по полу, возрасту и давности заболевания. За всеми больными осуществлялось наблюдение в течение трех лет. Оценивались: динамика заболевания (прогрессирование/регресс ХВН) на фоне реабилитационных мероприятий, а также развитие осложнений (в том числе, тромботических) и трофических расстройств. Математическую обработку проводили с использованием пакета программы Statistica 10 (StatSoft, США). Результаты были представлены в виде разнесенных по шкале среднеарифметических значений ± стандартного отклонения. Сравнение групп средних арифметических значений было проведено посредством непараметрического критерия Манна–Уитни. Разница в категориальных переменных была проанализирована посред-

ством χ^2 Пирсона и критерия Фишера. Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости (p), критический уровень значимости принимался при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Среди больных с проявлениями метаболического синдрома чаще встречались тяжелые формы ХВН (С4: 42%; С5: 4,8%; С6: 9,3%), в сравнении с контрольной группой (С4: 9,52%; классы С5, С6 — отсутствуют; $p<0,05$). Оперативному лечению в объеме комбинированной флебэктомии в срок от 3 до 15 лет назад были подвергнуты 15 пациентов основной и 20 пациентов контрольной групп. У большей части оперированных в группе с МС либо не было отмечено уменьшения клинической симптоматики ХВН, и в соответствии со шкалой VCSS тяжесть заболевания оставалась в интервале 15–30 бал., либо возник рецидив в первые 5 лет после вмешательства (10 наблюдений, причем в трех случаях из указанных потребовалось повторное оперативное вмешательство; в двух наблюдениях ранний послеоперационный период осложнился тромбозом бедренной вены). У пяти пациентов основной группы отмечен положительный эффект проведенного лечения (оценка по VCSS: 10–15 бал.) на фоне снижения массы тела, ежедневных физических упражнений и компрессионной терапии. У всех пациентов контрольной группы отмечена стойкая положительная динамика в различные сроки после оперативного лечения (оценка по VCSS: 10 бал. и менее). За время наблюдения у большей части больных с МС отмечено прогрессирование заболевания в виде усиления отека, пигментаций, появления трофических нарушений (25 обследованных). У больных основной группы значительно чаще регистрировались варикотромбофлебиты (17 обследованных), в то время как в контрольной отмечено лишь четыре случая подобных тромботических осложнений. Полученные данные подтверждают влияние компонентов МС на течение ХВН нижних конечностей. В литературе приводятся возможные механизмы этого воздействия. В частности, абдоминальное ожирение способствует венозному стазу за счет повышения внутрибрюшного давления [3, 5]. Кроме того, висцеральное ожирение, наравне с дислипидемией, служит дополнительным фактором риска тромбообразования [6], а гипергликемия может инициировать структурную перестройку венозной стенки [7].

Заключение. Тяжелое течение ХВН нижних конечностей (в том числе, с развитием тромботических осложнений) наблюдается у пациентов с МС. Изменение стиля жизни и реабилитационные мероприятия у лиц с МС положительно сказываются на степени тяжести ХВН.

Литература

1. *Pannier F., Rabe E.* Progression in venous pathology // Phlebology.— 2015.— Vol. 30, № 1.— P. 95–97.
2. *Кириенко А. И., Золотухин И. А., Юмин С. М., Селиверстов Е. И.* Варикозная болезнь нижних конечностей у женщин и мужчин: данные проспективного обсервационного исследования спектр // Ангиология и сосуд. хирургия.— 2012.— № 3.— С. 64–68.
3. The influence of abdominal pressure on lower extremity venous pressure and hemodynamics: a human in-vivo model simulating the effect of abdominal obesity / Willenberg T., Clemens R., Haegeli L. M., Amann-Vesti B., Baumgartner I., Husmann M. // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.— 2011.— Vol. 41, № 6.— P. 849–855.
4. *Fowkes F. J. I., Price J. F., Fowkes P. G. R.* The prevalence of deep venous thrombosis (review of the literature) // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.— 2003.— Vol. 25, № 1.— P. 1–5.
5. *Allman-Farinelli M. A.* Obesity and venous thrombosis: a review // Semin. Thromb. Hemost.— 2011.— Vol. 37, № 8.— P. 903–907.
6. *Yang G., Staercke C. De, Craig Hooper W.* The effects of obesity on venous thromboembolism: a review // Open J. Prev. Med.— 2012.— Vol. 2, № 4.— P. 499–509.
7. Management of chronic venous disorders of the lower limbs: guidelines according to scientific evidence / Nicolaides A. N., Allegra C., Bergan J., Bradbury A., Cairols M., Carpentier P., Comerota A., Delis C., Eklof B., Fassiadis N., Georgiou N., Geroulakos G., Hoffmann U., Jantet G., Jawien A., Kakkos S., Kalodiki E., Labropoulos N., Neglen P., Pappas P., Partsch H., Perrin M., Rabe E., Ramelet A. A., Vayssaira M., Ioannidou E., Taft A. // Int. Angiol.— 2008.— Vol. 27, № 1.— P. 1–59.

ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В ТКАНЯХ ГЛАЗНОЙ ПОВЕРХНОСТИ У КРОЛИКОВ ПОРОДЫ ШИНШИЛЛА С МОДЕЛЬЮ СИНДРОМА «СУХОГО ГЛАЗА»

[1]В. Ю. Попов, [1]В. В. Бржеский, [2]Н. М. Калинина

[1]Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Россия

[2]Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МСЧ России, Санкт-Петербург, Россия

popovvladimir221122@gmail.com

Введение. Как известно, ботулинический токсин-А (БТ-А), блокируя высвобождение ацетилхолина из пресинаптических терминалей холинергических нейронов, способствует снижению секреции экскреторными железами, в том числе и слезными. Представляет интерес возможность моделирования синдрома «сухого глаза» у кроликов с применением БТ-А и оценка особенностей воспалительного процесса в тканях глазной поверхности животных. [1, 2].

Цель. Изучить показатели местного иммунитета у кроликов породы Шиншилла с моделью синдрома «сухого глаза».

Материал и методы. Исследование выполнено на 10 кроликах (20 глаз) породы Шиншилла массой 2,5–3 кг. В условиях эфирной анестезии выполнены трансконъюнктивальные инъекции 5ЕД БТ-А (Botox, Allergan, Inc., США) с помощью иглы 29G в основную, Гардерову и подглазничную слезные железы [3]. До начала исследования и на 21-й его день определяли осмолярность слезной жидкости с помощью прибора TearLab Osmolarity System (TearLabCorp.,США) и содержание в ней цитокинов методом твердофазной ИФА: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, IL-1Ra, TNF-α, INF-α, INF-γ.

Результаты и их обсуждение. На 21-й день после инъекций БТ-А у животных отмечено достоверное снижение слезопродукции и развитие выраженных ксеротических изменений в эпителии глазной поверхности.

В слезной жидкости лабораторных животных на 21-й день эксперимента определяется статистически достоверное повышение уровня всех провоспалительных цитокинов в 1,6 и более раза (p<0,05–0,001). При этом уровень INF-α увеличился в 1,8 раза (p<0,05), что отражает активацию врожденного иммунитета. В то же время продукция IL-10, обладающего выраженным противовоспалительным действием, уменьшилась относительно исходных показателей в 1,9 раза (p<0,001).

Изменение уровня провоспалительных цитокинов сопровождалось достоверным повышением осмолярности прероговичной слезной пленки (p<0,05), закономерно стимулирующей развитие воспалительного процесса в тканях глазной поверхности.

Выводы. Таким образом, трансконъюнктивальные инъекции БТ-А в слезные железы кролика приводят к значительному повышению уровня эндогенных иммуномедиаторов-цитокинов в прероговичной слезной пленке лабораторных животных на фоне развивающегося у них роговично-конъюнктивального ксероза и, как следствие, к развитию воспалительного процесса в тканях глазной поверхности.

Таблица

Динамика лабораторных показателей слезной жидкости экспериментальных животных с моделью синдрома «сухого глаза» (n=20)

Оцениваемый параметр	Этапы наблюдения (сутки)	
	0 (до введения препарата)	21
IL-1 β, пг/мл	27,11±1,58	58,38±1,04*
IL-2, пг/мл	34,44±2,06	74,55±1,16*
IL-4, пг/мл	32,10±1,09	51,90±1,57*
IL-6, пг/мл	35,54±3,05	84,05±1,24*
IL-8, пг/мл	24,70±1,38	50,20±2,01*
IL-10, пг/мл	76,40±1,85	40,25±1,51*
IL-17A, пг/мл	52,80±1,29	84,12±1,35*
RaIL1, пг/мл	40,75±1,47	76,15±1,93*
INF-α, пг/мл	16,80±2,44	30,85±1,77*
TNF-α, пг/мл	33,07±2,93	67,07±0,81*
Осмолярность, мОсм/л	301,0±15,4	344,0±21,1*

* — различия по сравнению с исходными величинами статистически значимы; p<0,05–0,001

Литература

1. *Barabino S., Dana M. R.* Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.— 2004.— Vol. 45, № 6.— P. 1641–1646.
2. *Osako M., Keltner J. L.* Botulinum A toxin (Oculinum) in ophthalmology // Surv. Ophthalmol.— 1991.— Vol. 36.— P. 28–46.
3. *Sakai T.* Major ocular glands (harderian gland and lacrimal gland) of the musk shrew (Suncusmurinus) with a review on the comparative anatomy and histology of the mammalian lacrimal glands // J. Morphol.— 1989.— Vol. 201.— P. 39–57.

ДИАГНОСТИКА БРУКСИЗМА С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОГРАММЫ «OSTEOVIZOR»

[1]С. П. Рубникович, [1]И. Н. Барадина, [2]Д. М. Бородин

[1]Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

baradin.denis@gmail.com

Введение. Одними из методов диагностики при оказании медицинской помощи пациентам с бруксизмом являются лучевые методы, которые могут являться обязательными: ортопантомография и рентгенография височно-нижнечелюстных суставов (ВНЧС), и дополнительными (по медицинским показаниям) магниторезонансная

томография или компьютерная томография ВНЧС. Однако в практическом здравоохранении применение его имеет определенные трудности в оценке и трактовке анатомо-топографических изменений в ВНЧС. Устранение данных недостатков и упрощение работы по оценке изменений в ВНЧС мы в данной работе установили задачей.

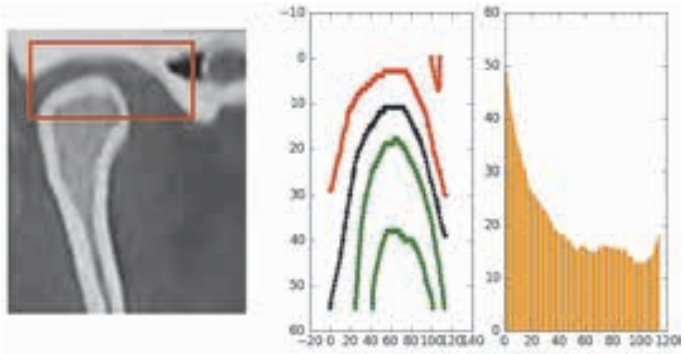


Рисунок. Скриншот работы программы и вывод расчёта параметров суставной щели левого ВНЧС пациентки В. в возрасте 24 лет.

Цель исследования: у пациентов с бруксизмом повысить эффективность диагностики путем разработки и применения новой методики визуализации с анализом рентгеновских изображений на основании данных КЛКТ в программе «Osteovizor».

Материалы и методы. Для решения поставленной цели исследования проведен анализ 30 КЛКТ ВНЧС и 20 снимков в боковой проекции ВНЧС у пациентов с бруксизмом при ортогнатическом прикусе по традиционной общепринятой методике анализа изображения и предложенной нами методике программе «Osteovizor». Каждый сустав каждого снимка был проанализирован группой из 15 специалистов, при этом оценивали общее время на проведение измерения параметра **b** пациента верхнесуставной щели обоих ВНЧС. Анализ полученных изображений в прикусе проводили по комбинированной методике [1, 2]. Статистический анализ выполняли на языке программирования R. Применялись методы статистической обработки: для оценки согласованности получаемых измерений использовали одновыборочный t-критерий статистического отличия от нуля разности значений двух методов измерений, для оценки воспроизводимости считали коэффициенты вариации, а для оценки затрачиваемого времени применили однофакторный дисперсионный анализ.

Результаты и их обсуждение. Нами была разработана методика анализа компьютерного изображения с учетом диагностических критериев в определении состояния ВНЧС: 1) размер суставной щели в переднем, верхнем и заднем направлениях; 2) площадь суставной щели в плоскостном изображении; 3) наличие деструкции костных элементов и выявление остеофитов, оксалатов и прочих отложений на поверхности суставной головки. Методика анализа компьютерного изображения заключалась в следующем: для получения результатов врачу необходимо загрузить КЛКТ или рентгенограмму боковой проекции ВНЧС, определить линию среза или зону исследования. Далее врачу нужно выделить участок исследования и проанализировать набор графиков отображения исследуемых характеристик в каждом ВНЧС (см. рисунок).

Нулевая гипотеза относительно отсутствия отличия между стандартным и предлагаемым нами методом подтвердилась. Так разности значений двух методов измерений статистически не отличается от нуля, p-value=0,6628. Воспроизводимость оценивали при помощи коэффициентов вариации. У метода, разработанного нами коэффициент вариации оказался равным 3,21%, а у стандартного метода равным 13,16%. Это позволяет утверждать, что предлагаемый нами метод обладает большей диагностической воспроизводимостью.

Затрачиваемое время на анализ рентгенологического исследования оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа. Время, затрачиваемое на анализ одной КЛКТ (обоих суставов) при традиционном стандартном способе составило 432,47±49,94 сек, а предложенным нами способом составляло 126,82±16,80 сек., что в 3,41 раза меньше.

Выводы

1. Анализ согласованности полученных данных разработанного нами алгоритма оценки состояния ВНЧС и традиционного общепринятого метода показал, что данные полученные обоими методами согласованы и разность значений двух методов измерений статистически не отличается от нуля, а алгоритм оценки состояния суставной щели и структурных элементов ВНЧС разработанной нами методики имеет высокую воспроизводимость, что улучшает диагностику пациентов с бруксизмом и повышает эффективность лечения.

2. Анализ временных затрат двумя методикам измерения, традиционной общепринятой и разработанной нами методики определения бруксизма показал, что предлагаемый нами алгоритм автоматической оценки оказался в 3,4 раза ($p=2\times10^{-16}$) быстрее, что приводит к уменьшению затрат во времени на выполнение диагностической манипуляции.

Литература

1. *Персин Л. С.* Ортодонтия. Диагностика и лечение зубочелюстно-лицевых аномалий и деформаций: учебник / Л. С. Персин.— М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015.— 640 с.
2. *Рабухина Н. А.* Стоматология и челюстно-лицевая хирургия: атлас рентгенограмм / Н. А. Рабухина, А. П. Аржанцев.— М.: МИА, 2002.— 302 с.
3. *Рубникович С. П.* Инновационные технологии лечения пациентов с дисфункцией височно-нижнечелюстных суставов / С. П. Рубникович, И. Н. Барадина // Кубанск. науч. вестн.— 2014.— № 4.— С. 98–102.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ У ПАЦИЕНТОВ МУЖСКОГО И ЖЕНСКОГО ПОЛА ПРИ МИОКАРДИТЕ

[1,2]*А. Л. Рунов*, [1]*Е. В. Курчакова*, [2]*О. М. Моисеева*, [2]*Л. Б. Митрофанова*, [1,2]*М. С. Вонский*
[1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
[2]Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия
tsinakan@gmail.com

Введение. Развитие количественных методов анализа нуклеиновых кислот открыло новые перспективы для исследования патологических состояний. Выполняемые с помощью гибридизации на микрочипах транскриптомные исследования позволяют получить картину изменения экспрессии генов в пораженной ткани, идентифицировать потенциальные РНК-биомаркеры патологии. Количественная оценка содержания мРНК, проводимая с помощью метода ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР-РВ), открывает возможность создания объективных диагностических критериев для скрытых и сложнообнаруживаемых патологий [1].

Одним из распространённых заболеваний, требующих разработки новых диагностических подходов, является миокардит. Миокардит — воспалительное заболевание сердечной мышцы, часто протекающее бессимптомно или с неспецифическими клиническими проявлениями. При этом оно может сопровождаться осложнениями, ведущими к инвалидности, а в некоторых случаях — к летальному исходу. Несмотря на длительную историю исследований миокардита, его диагностика до сих пор остаётся сложной задачей [2]. В настоящее время золотым стандартом для диагностики миокардитов является иммуногистохимическое исследование препаратов эндомиокардиальных биопсий (ЭМБ). Постановка диагноза миокардит является результатом экспертной оценки, требующей высокой квалификации врача. Актуальным представляется поиск новых методов диагностики, позволяющий определять наличие заболевания на ранних стадиях с использованием объективных оценочных параметров, исключающих влияние человеческого фактора.

Материалы и методы. В исследование включали пациентов ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» с верифицированным миокардитом, которым выполняли эндомиокардиальную биопсию (ЭМБ) миокарда правого желудочка (20 образцов, 12 М, 8 Ж, 37–62 лет). В качестве контрольного материала ткани здорового миокарда использовали аутопсийные фрагменты, взятые при ортотопической трансплантации сердца (6 образцов, 4 М, 2 Ж). РНК выделяли с помощью коммерческого набора AllPrepTM DNA/RNA Micro Kit (QIAGEN, Germany). Обратную транскрипцию проводили с использованием коммерческого набора RevertAidTM FirstStrand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania) с oligo(dT)18 праймерами. ПЦР-РВ проводили с использованием коммерческого набора реагентов R-412 для ПЦР-РВ (Synthol, Russia). В качестве референтной использовалась определенная нами ранее оптимальная комбинация генов — *GapdH* и *HPRT1* [3]. Анализ результатов выполняли с помощью свободно распространяемого пакета Rest-2009.

Результаты и их обсуждение. Методом ОТ-ПЦР-РВ было исследовано содержание мРНК 30 генов в образцах ЭМБ. Было выявлено совпадение модуляции экспрессии шести генов (*FCER1G*, *IL2*, *NOTCH2*, *SEC24A*, *SIGLEC1* и *TMOD3*) у пациентов мужского и женского пола. При этом содержание мРНК у мужчин и женщин существенно различались (см. табл.). Кроме того, нами была выявлена разнонаправленная модуляция экспрессии гена *ADCY7* у пациентов с миокардитом: гиперэкспрессия в группе мужчин и подавление экспрессии в группе женщин. Помимо этого, для пациентов мужского пола было показано изменение экспрессии 3-х генов (*GLIPR*, *ITGB2*, *NF-kB*), уровни содержания мРНК для которых у пациентов женского пола достоверно не отличались от контрольных. Модуляция экспрессия 5-ти генов (*ACOX1*, *CD1D*, *CD14*, *CD8B1* и *HRH3*) выявлена только у пациентов женского пола. Количественные результаты ОТ-ПЦР-РВ представлены в таблице.

Таблица

Изменение экспрессии генов в препаратах ЭМБ у пациентов с миокардитом относительно контрольной группы здоровых доноров

Ген	Изменение экспрессии (х раз)		Ген	Изменение экспрессии (х раз)	
	м	ж		м	ж
FCER1G	▲ 113,2	▲ 15,7	*GLIPR*	▼ 3,0	нет
IL2	▼ 4,7	▼ 2,3	*ITGB2*	▲ 8,7	нет
NOTCH2	▼ 2,6	▼ 2,0	*NF-kB*	▼ 5,0	нет
SEC24A	▼ 2,7	▼ 4,4	*ACOX1*	нет	▲ 6,5
SIGLEC1	▲ 8,0	▲ 9,1	*CD1D*	нет	▲ 10,6
TMOD3	▼ 2,9	▼ 9,9	*CD14*	нет	▼ 2,2
ADCY7	▲ 7,1	▼ 19,6	*CD8B1*	нет	▼ 1,6
			HRH3	нет	▲ 4,0

P<0,035

Выводы. Таким образом, нами было показано, что развитие вирусного миокардита сопровождается изменениями в паттернах экспрессии в ткани сердца. Данные

изменения дифференцированы в соответствии с полом пациентов. Согласованная модуляция экспрессии у мужчин и женщин детерминирует гены, ответственные за развитие миокардита по общему механизму, тогда как транскрипционные изменения, дифференцирующие группы по половому признаку, могут определять физиологические различия ответа мужского и женского организмов на заболевание. Изменения в экспрессии генов, идентифицированные в данном исследовании, могут быть использованы при выборе РНК-биомаркеров миокардита.

Литература

1. Transcriptomic biomarkers for the accurate diagnosis of myocarditis / Heidecker B., Kittleson M. M., Kasper E. K., Wittstein I. S., Champion H. C., Russell S. D., Hruban R. H., Rodriguez E. R., Baughman K. L., Hare J. M. // Circulation.— 2011.— Vol. 123.— P. 1174–1184.
2. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases / Caforio A. L., Pankuweit S., Arbustini E., Basso C., Gimeno-Blanes J., Felix S., Fu M., Helio T., Heymans S., Jahns R., Klingel K., Linhart A., Maisch B., McKenna W., Mogensen J., Pinto Y., Ristic A., Schultheiss H-P., Seggewiss H., Tavazzi L., Thiene G., Yilmaz A., Charron P., Elliott P. // Eur. Heart J.— 2013.— Vol. 34 (33).— P. 2636–2648
3. Selection of reference genes for transcription analysis in myocarditis / Runov A. L., Kurchakova E. V, Khaschevskaya D. A., Moiseeva O. M., Vonskii M. S. // Cell and Tissue Biology.— 2015.— Vol. 9(4).— P. 330–335.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА С КОМПЛЕКСОМ ЛАКТОФЕРРИНА И ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

А. В. Соколов, А. Ю. Власенко, В. А. Костевич, Э. А. Старикова, Е. Т. Захарова, В. Б. Васильев
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

biochemsokolov@gmail.com

Введение. Ранее нами было показано, что катионный трансферрин экзокринных секретов и гранул нейтрофилов, лактоферрин (ЛФ), формирует специфический комплекс с медьсодержащим белком плазмы крови, церулоплазмином (ЦП), *in vivo* и *in vitro* [1, 2]. Для многих белков молока, например альфа-лактальбумина, показано формирование комплексов с олеиновой кислотой (HAMLET) с выраженной активностью против раковых клеток. Недавно цитотоксический комплекс с олеиновой кислотой был описан и для лактоферрина из молока коров [3].

Целью нашей работы было сравнение возможности и специфичности образования *in vitro* и *in vivo* многокомпонентных комплексов, включающих ЛФ (человека и коровы), ЦП и олеиновую кислоту, а также функциональные последствия такого взаимодействия.

Материалы и методы исследования. Препараты ЛФ были получены из молока с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Препарат ЦП получали из плазмы крови методом хроматографии на UNOSphere Q и неомицин-агарозе [4]. Для оценки взаимодействия белков использовали методы аффинной хроматографии, диск-электрофореза и технику поверхностного плазмонного резонанса (Biacore X100, GE-Healthcare, США). Концентрацию жирных кислот определяли с помощью специфических диагностических наборов на неэстерифицированные жирные кислоты (Randox). Эксперименты на крысах линии «Вистар» были проведены с соблюдением правил биоэтики и одобрены локальным этическим комитетом. Цитотоксичность оценивали с помощью метода проточной цитометрии с использованием красителей PI и Yo-Pro-1, позволяющих дифференцировать жизнеспособные клетки от клеток на стадии некроза и апоптоза.

Результаты и их обсуждение. В течение 1–5 часов после внутрибрюшинной инъекции крысам ЛФ человека либо ЛФ коровы (100 мг/кг) мы обнаружили увеличение концентрации неэстерифицированных жирных кислот в 1,5–4,2 раза, а также образование гетерологичных комплексов ЦП крыс с ЛФ по данным Вестерн-блоттинга и специфической окраски активности ЦП о-дианизидином. В комплексе ЦП-ЛФ, выделенном из сыворотки крыс, была обнаружена олеиновая кислота, что подтверждает наше предположение о возможности образования комплекса между ними *in vivo*.

При добавлении раствора олеиновой кислоты в этаноле к ЛФ мы не наблюдали образования мицелл, характерного для смешивания олеиновой кислоты с водой и физиологическим раствором. Титрование ЛФ олеиновой кислотой показало, что один моль ЛФ может связать до 8 моль олеиновой кислоты. При этом ЛФ человека и коровы практически не отличались по способности к связыванию жирной кислоты. Оба комплекса показали практически идентичную аффинность к ЦП по данным электрофореза, поверхностного плазмонного резонанса и аффинной хроматографии на агарозном геле с иммобилизованным ЦП. Комплексы ЛФ с олеиновой кислотой индуцировали апоптоз раковых клеток (HL-60, THP-1, Jurkat) и лимфоцитов, выделенных из периферической крови человека, а также дозозависимым образом инициировали гемолиз эритроцитов. Однако присутствие ЦП в среде предотвращало описанные цитотоксические эффекты.

Таким образом, взаимодействие ЦП с комплексом ЛФ и олеиновой кислоты может модулировать его цитотоксическую активность.

Исследование поддержано грантом Президента РФ МК-5074.2016.4.

Литература

1. Effect of lactoferrin on oxidative features of ceruloplasmin / Sokolov A. V., Ageeva K. V., Pulina M. O., Zakharova E. T., Vasilyev V. B. // Biometals.— 2009.— Vol. 22, № 3.— P. 521–529.
2. Lactoferrin, myeloperoxidase, and ceruloplasmin: complementary gearwheels cranking physiological and pathological processes / Sokolov A. V., Zakahrova E. T., Kostevich V. A., Samygina V. R., Vasilyev V. B. // Biometals.— 2014.— Vol. 27, № 5.— P. 815–828.
3. Bovine lactoferrin binds oleic acid to form an anti-tumor complex similar to HAMLET / Fang B., Zhang M., Tian M., Jiang L., Guo H. Y., Ren F. Z. // Biochim. Biophys. Acta.— 2014.— Vol. 1841, № 4.— P. 535–543.
4. Двухстадийный метод получения церулоплазмина на основе его взаимодействия с неомицином / Соколов А. В., Костевич В. А., Романико Д. Н., Захарова Е. Т., Васильев В. Б. // Биохимия.— 2012.— Т. 77, № 6.— С. 775–784.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПСИХОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ БЕРЕМЕННЫХ И НЕБЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ЖЕЛУДОЧКОВОЙ АРИТМИЕЙ

Е. Ю. Сопилова

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

elenasopilova@mail.ru

Введение. Все чаще стресс становится одним из ведущих звеньев патогенеза различных соматических заболеваний, заставляющих пациента обратиться к врачу. В настоящее время существуют достоверные данные о вкладе психоэмоционального фактора в генез идиопатической желудочковой аритмии (ЖА).

Цель. Сравнить психоэмоциональные особенности у беременных и небеременных женщин с идиопатической ЖА на основании анализа данных психологической диагностики (ПД).

Материал и методы. Из 144 пациенток после обследования (ЭКГ и ЭХОКГ в пределах нормы) было выделено 3 группы женщин (M=28,5±9,5 лет): I — беременные с идиопатической ЖА, II — небеременные с ЖА, у которых во время холтеровского мониторирования зарегистрировано патологическое количество преждевременных желудочковых эктопических комплексов, III (контрольная группа) — беременные без ЖА. Всем пациенткам была проведена ПД по следующим методикам: интегративный тест тревожности (личностная и ситуативная тревожность), шкала самооценки депрессии Цунга, методика диагностики доминирующего состояния Куликова.

Результаты. По результатам ПД в I по сравнению с III группой значимо выше личностная и ситуативная тревожность ($p<0,05$) с преобладанием эмоционального дискомфорта, астенического компонента тревожности и тревожной оценки перспективы. При сравнении обследуемых I и II групп, у I преобладает личностная и ситуативная тревожность ($p<0,05$), у пациенток II группы устойчивее эмоциональный фон и значимо выше жизненный тонус.

Выводы. Таким образом, все женщины с идиопатической ЖА склонны к тревожным расстройствам. Максимальный уровень тревожности наблюдался у небеременных женщин с ЖА. У беременных женщин с ЖА выше уровень тревожности по сравнению с беременными без аритмии.

Литература

1. *Burg M.* Psychological Traits and Emotion-Triggering of ICD Shock-Terminated Arrhythmias / Burg M., Lampert R., Joska T., Batsford W., Jain D. // Psychosomatic Medicine.— 2004.— Vol. 66 (6).— P. 898–902.
2. *Chi J. S.* Cardiovascular mortality in New York City after September 11, 2001 / Chi J. S., Poole W. K., Kandefer S. C., Kloner R. A. // The American Journal of Cardiology.— 2003.— October 1.— Vol. 92 (7).— P. 857–861.
3. *Dimsdale J. E.* Psychological stress and cardiovascular disease // Journal of the American College of Cardiology.— 2008.— April 1.— Vol. 51 (13).— P. 1237–1246.
4. *Pickering T. G., Miller N. E.* Learned voluntary control of heart rate and rhythm in two subjects with premature ventricular contractions // British Heart Journal.— 1977.— Vol. 39.— P. 152–159.
5. *Ziegelsteiin R. C.* Acute Emotional Stress and Cardiac Arrhythmia // The Journal of the American Medical Association.— 2007.— July 18.— Vol. 298 (3).— P. 324–329.

Наши подписные индексы:
Агентство «Роспечать» — **57999**
Объединенный каталог «Пресса России» — **42190**

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА СТРЕПТОКОККА, МУТАНТНОГО ПО ГЕНУ М-БЕЛКА

[1]*М. А. Суворова*, [1]*А. Н. Цапиева*, [1]*Н. В. Дуплик*, [1]*Т. А. Крамская*, [1]*К. Б. Грабовская*, [1]*Е. П. Киселёва*, [3]*В. А. Черешнев*, [1,2]*А. Н. Суворов*

[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

[2]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

[3]Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия

maria_suvorova@mail.ru

Введение. Стрептококки группы А (СГА), относящиеся к виду *Streptococcus pyogenes*, являются наиболее распространенными и хорошо изученными патогенами человека, вызывающими такие заболевания, как фарингит, скарлатина, стрептодермия, рожистое воспаление, стрептококковый сепсис. Ранее было показано, что, несмотря на значительный патогенный потенциал, данные бактерии могут замедлять и даже приостанавливать развитие онкологических заболеваний [1]. Вирулентность стрептококков определяется способностью синтеза ими широкого набора белковых и полисахаридных продуктов, главным из которых является так называемый М-белок, препятствующий фагоцитозу данных бактерий.

Цель исследования: конструирование штамма СГА, лишенного М-белка.

Материалы и методы. Штамм *S. pyogenes* «Гуров» серотипа М39 был любезно предоставлен академиком В. А. Черешневым. *S. pyogenes* выращивали в среде Todd Hewitt (BD Diagnostics, США), содержащей 0,5% дрожжевого экстракта, при 37° С. Фрагмент гена М-белка серотипа 39 (*emm39*) амплифицировался посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с ДНК-праймерами acagaagcttaggcggaggatcattg и atttcttaagatgctgccatagctt, а для получения амплификата *emm39* со вставкой гена *erm* и последующей проверки правильности интеграции использовались ДНК-праймеры *erm1*-gggcccaaaatttgtttga, *erm2*-tcggcagcgactcatagaat и *emm3*-agtcgtaggagcagggttagc. Генноинженерные манипуляции (выделение плазмидной и хромосомной ДНК, гидролиз ДНК эндонуклеазами, трансформация кишечной палочки) осуществлялись в соответствии с известными протоколами [2]. Интегративная плазмида *p7ermB* была любезно предоставлена Р. МакЛохланом (США). Клоны кишечной палочки с геном *emm39* отбирали на плотной питательной среде с 500 мг/мл эритромицина, а клоны стрептококков — с 2,5 мг/мл эритромицина. Трансформацию стрептококков производили методом электропорации [3]. Стабильность маркера в стрептококках проверялась посредством длительного культивирования стрептококков в жидких питательных средах (48 и 96 генераций) без антибиотика с последующим счетным высевом на чашки с эритромицином и без него. Мышиные перитонеальные клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10%-й фетальной сыворотки и гентамицина в CO_2-инкубаторе. Макрофаги инкубировали с бактериями в соотношении 1:10 в течение 30 мин при 37° С в 5%-м CO_2. Расчет данных фагоцитоза производился по фагоцитарному числу (среднее количество стрептококков на клетку) и по фагоцитарному индексу (отношение среднего числа стрептококков к проценту инфицированных макрофагов). Для конструирования штамма *S. pyogenes*, неспособного экспрессировать М-белок, использовали штамм «Гуров» серотипа М39, ранее применявшийся в лечении онкологических заболеваний. Для получения штамма, лишенного основного фактора вирулентности, участок гена, кодирующий центральную часть гена М-белка, был проклонирован в интегративную плазмиду *p7ermB*, неспособную реплицироваться в стрептококках. На матрице хромосомной ДНК ставили ПЦР, после чего фрагмент гена *emm39* встраивали в *p7ermB*, и трансформировали штамм кишечной палочки JM109. Плазмидная ДНК, выделенная из рекомбинантных клонов, содержала вставку с геном М-белка (380 п. н.). Эта ДНК использовалась для трансформации стрептококков штамма «Гуров» с последующей селекцией устойчивых к эритромицину клонов. Клоны проверялись на наличие искомой конструкции с использованием ПЦР с ДНК-праймерами к участкам гена *emm39* за пределами вставки (*emm3*) и гена устойчивости к эритромицину (*erm1* и *erm2*). Эксперименты по проверке вирулентности и токсичности исходного штамма «Гуров» по сравнению с мутантным штаммом «Гуров» проводили на мышах линии C3HA с ранее привитыми клетками гепатомы 22а. Стрептококки вводили лабораторным животным в область развившейся солидной опухоли в объеме 50 мкл (50000 КФЕ) на животное. После введения штаммов оценивали результаты выживаемости мышей по методу Гехана.

Результаты и их обсуждение. Результаты секвенирования показали, что интеграция плазмиды происходила в области гена *emm39* с прерыванием его последовательности. Клон мутантного штамма «Гуров» был исследован в экспериментах по оценке способности перитонеальных макрофагов фагоцитировать СГА. «Отключение» гена М-белка у стрептококков достоверно повышало способность макрофагов фагоцитировать бактерии, о чем судили по увеличению как фагоцитарного числа ($p<0,001$), так и фагоцитарного индекса ($p<0,001$). Учитывая, что основным свойством М-белка СГА является препятствие фагоцитозу, данный тест наиболее объективно доказывал функциональные изменения в полученном мутантном клоне. Проверка выживаемости мышей в течение 16 сут после введения различных штаммов стрептококков в область развившейся гепатомы показала достоверное ($p<0,05$) снижение уровня летальности в группе мышей, инфицированных мутантным штаммом «Гуров».

Заключение. В результате инсерционного мутагенеза гена *emm39* в штамме «Гуров» был сконструирован мутантный клон данного штамма со сниженной вирулентностью и повышенной чувствительностью к фагоцитозу макрофагами. Полученные данные позволяют рассматри-

вать полученный штамм в качестве перспективного кандидата для исследования противоопухолевой активности СГА.

Список литературы

1. *Maletzki C., Gock M., Klier U., Klar E., Linnebacher M.* Bacteriolytic therapy of experimental pancreatic carcinoma // World J. Gastroenterol.— 2010.— Vol. 16, № 28.— P. 3546–3552.
2. *Maniatis G. M.* Erythropoiesis: a model for differentiation // Prog. Clin. Biol. Res.— 1982.— Vol. 102, pt A.— P. 13–24.
3. *Suvorov A. N., Kok J., Venema G.* Transformation of group A streptococci by electroporation // FEMS Microbiol. Lett.— 1988.— Vol. 56, Iss. 1.— P. 95–100.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРОТИВ НАТИВНЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫЗЫВАЕТ У КРЫС WISTAR АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АОРТЫ И ВИСЦЕРАЛЬНОЕ ОЖИРЕНИЕ

Д. Н. Сунцова, К. В. Фомина, Л. В. Бедулева, А. А. Конорюкова, М. А. Кузина, А. Ю. Сидоров

Удмуртский государственный университет, Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

fomiksa@yandex.ru

Введение. Механизм, запускающий и поддерживающий воспаление в стенке сосудов и ведущий к формированию атеросклеротической бляшки, остается до конца не ясен. Ранее мы показали, что иммунизация крыс Wistar нативными липопротеинами низкой плотности (нЛПНП) вызывает сходные с атеросклеротическими изменения стенки аорты, такие как инфильтрация лейкоцитами, разрушение интимы, дезорганизация медии [1]. Кроме изменений в стенке аорты, у крыс, иммунизированных нЛПНП, был обнаружен эпикардиальный жир, который являясь источником провоспалительных цитокинов, рассматривается сегодня как фактор развития атеросклеротических изменений коронарных сосудов снаружи внутрь [2]. В то же время, показано, что висцеральный жир, локализованный в брюшной полости, может играть не менее значимую роль в патогенезе атеросклероза [3]. Кроме того, у крыс, в отличие от человека, основной фракцией липопротеинов плазмы являются не липопротеины низкой плотности (ЛПНП), а липопротеины высокой плотности (ЛПВП) [4].

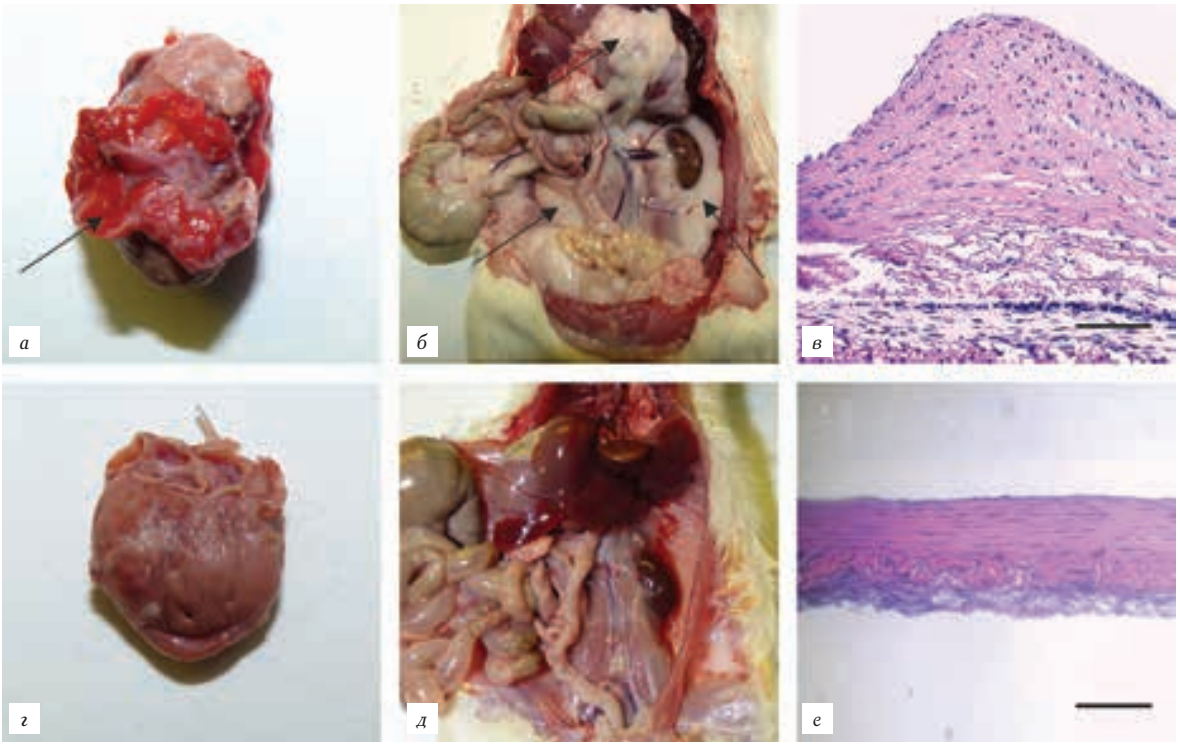


Рисунок. Эпикардиальный жир, внутриабдоминальный жир, стенка аорты крыс.

Обозначения: *а*, *г* — эпикардиальный жир; *б*, *д* — внутриабдоминальный жир; *в*, *е* — стенка аорты; *а–в* — крысы, иммунизированные нЛПВП; *г–е* — контрольные крысы. Окраска: сердце — судан III; стенка сосуда — гематоксилин — эозин. Масштабный отрезок равен 130 мкм. Стрелками указан жир.

Цель исследования: выяснить, может ли иммунный ответ против нативных ЛПВП (нЛПВП) вызывать ате-

росклероз у крыс, а также выяснить, увеличивается ли объем внутриабдоминального жира у крыс, иммунизированных нативными липопротеинами.

Материалы и методы. Крысы Wistar, 7 самцов и 6 самок, были иммунизированы нЛПНП, а также 12 самцов и 5 самок — нЛПВП человека (Kalen Biomedical, США) в составе неполного адъюванта Фрейнда (НАФ; Sigma, США), однократно, в дозе 200 мкг. Контрольные крысы получали инъекцию только НАФ. Титр антител против нЛПНП и нЛПВП человека определяли методом иммуноферментного анализа. Для выявления эпикардиального жира сердце окрашивали суданом III. Также оценивали содержание внутриабдоминального жира.

Результаты и их обсуждение. Иммунизация нЛПНП и нЛПВП вызвала у крыс хроническую продукцию антител против липопротеинов, которая сопровождалась появлением эпикардиального жира, увеличением, по сравнению с контролем, объема внутриабдоминального жира и атеросклеротическими изменениями стенки аорты. Выявленные изменения представлены на примере крысы, иммунизированной нЛПВП (рисунок.). Объемы эпикардиального и внутриабдоминального жира коррелировали. Увеличение объема висцерального жира было выявлено у 40% крыс, иммунизированных нЛПНП, и у 80% крыс, иммунизированных нЛПВП, и не зависело от пола.

Заключение. Иммунный ответ против нативных ЛПНП и ЛПВП, вызывает у крыс Wistar висцеральное ожирение (увеличение объема внутриабдоминального жира, появление эпикардиального жира) и атеросклеротические изменения в стенке аорты. Иммунизация крыс Wistar нативными ЛПНП или ЛПВП может рассматриваться как простая в исполнении, хорошо воспроизводимая экспериментальная модель атеросклероза и висцерального ожирения, пригодная, в т. ч., для выяснения природы связи между висцеральным ожирением и атеросклеротическими изменениями сосудов.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства образования и науки РФ на проведение НИР по теме «Аутоиммунные механизмы развития атеросклероза. Новая экспериментальная модель атеросклероза у крыс» № 2054.

Литература

1. Rheumatoid factor in idiotypic regulation of autoimmunity / Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E., Fomina K., Lobanova O., Ivanov P., Terentiev A. // Int. J. Rheum. Dis.— 2015.— Vol. 18, № 4.— P. 408–420.
2. *Verhagen S. N., Visseren F. L.* Perivascular adipose tissue as a cause of atherosclerosis // Atherosclerosis.— 2012.— Vol. 214, № 1.— P. 3–10.
3. Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease / Cheng K. H., Chu C. S., Lee K. T., Lin T. H., Hsieh C., Chiu C. C., Voon W. C., Sheu S. H., Lai W. T. // Int. J. Obes. (Lond.).— 2008.— Vol. 32, № 2.— P. 268–274.
4. *Gwynne J. T., Mahaffee D., Brewer H. B. Jr, Ney R. L.* Adrenal cholesterol uptake from plasma lipoproteins: regulation by corticotropin // Proc. Natl Acad. Sci.— 1976.— Vol. 73, № 12.— P. 4329–4333.

КОРРЕКЦИЯ ГИПОТАЛАМИЧЕСКОЙ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС С ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА С ПОМОЩЬЮ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫХ ИНСУЛИНА И СЕРОТОНИНА

И. Б. Сухов, К. В. Деркач, О. В. Чистякова, В. М. Бондарева, А. О. Шпаков
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

suhov_ivan88@mail.ru

Введение. Одной из причин метаболических нарушений, возникающих при сахарном диабете 2-го типа (СД2), а также осложнений этого заболевания являются функциональные изменения в инсулиновой и серотониновой системах гипоталамуса [1, 2]. Эти изменения во многом обусловлены снижением уровня инсулина и серотонина в ЦНС. Повышение уровня инсулина и серотонина в ЦНС должно способствовать восстановлению инсулиновой и серотониновой систем в гипоталамусе и может рассматриваться как один из подходов для предотвращения осложнений СД2 и нормализации энергетического гомеостаза.

Цель работы состояла в изучении влияния пятинедельного лечения крыс с неонатальным СД2 интраназальными инсулином (ИИ) и серотонином (ИС) на метаболические показатели и активность аденилатциклазы (АЦ) в гипоталамусе.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на самцах крыс Wistar. СД2 вызывали в/б введением пятидневным крысятам стрептозотоцина (75 мг/кг). В возрасте 2.5–3 мес у крыс развивались признаки СД2. ИИ вводили в дозе 0,48 МЕ/крысу/день, ИС — в дозе 20 мкг/крысу/день. Обработку животных ИИ и ИС проводили на протяжении 5 недель. Активность аденилатциклазы (АЦ, EC 4.6.1.1) во фракциях плазматических мембран, выделенных из гипоталамуса крыс, определяли, как описано ранее [2]. Уровень экспрессии генов определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с помощью прибора 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием SYBR

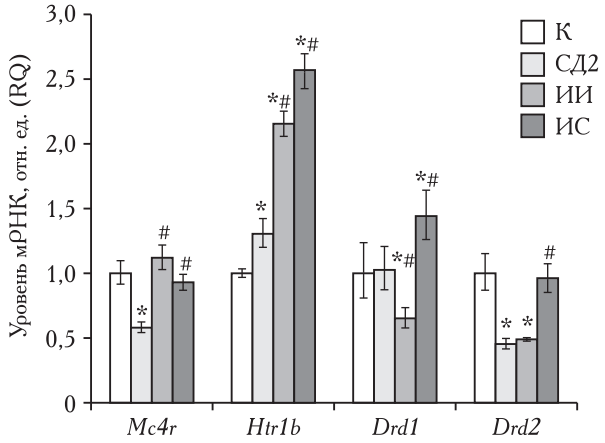


Рисунок. Уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих рецепторные белки, в гипоталамусе крыс с неонатальным СД2 с обработкой и без обработки ИИ и ИС. Обозначения: Данные представлены в виде M±SEM, во всех группах n=5. Значения RQ рассчитаны по отношению к контрольной группе. Различия между группами К и СД2 и между группами К и ИИ, К и ИС (*), а также между группами СД2 и ИИ, СД2 и ИС (#) достоверны при P<0,05.

Green Master Mix (Евроген, Россия), как описано ранее [3]. Расчет экспрессии целевого гена проводили по методу ΔΔCT. В качестве эндогенного контроля использовали гены глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*Gapdh*) и β-актина (*Actb*). Все данные представлены в виде относительных единиц уровня мРНК целевого гена (RQ), расчет которых проводили по отношению к контрольной группе.

Результаты и их обсуждение. С помощью глюкозотолерантного и инсулинглюкозотолерантного тестов было показано, что лечение диабетических крыс ИИ нормализовало толерантность к глюкозе и ее утилизацию под действием экзогенного инсулина. Лечение ИС в этом отношении было менее эффективным. Лечение ИИ и ИС также восстанавливало активность гипоталамической меланокортиновой системы, повышая уровень экспрессии гена *Mc4r* для МК4-меланокортинового рецептора (рис.) и усиливая стимулирующий эффект МК4-агонистов на активность АЦ в мембранах, выделенных из гипоталамуса крыс. При этом повышалась экспрессия гена *Htr1b*, кодирующего 5-HT_{1B}-серотониновый рецептор (рис.), и восстанавливались ингибирующие АЦ эффекты 5-HT_{1B}-агонистов. Лечение ИИ и ИС меняло соотношение экспрессии генов, кодирующих D1- и D2-дофаминовые рецепторы (*Drd1*, *Drd2*), в пользу *Drd2* (рис.), а также восстанавливало ингибирующий АЦ эффект D2-агонистов.

Заключение. Таким образом, лечение ИИ и ИС крыс с СД2 восстанавливает чувствительность АЦ гипоталамуса к МК4-агонистам и моноаминам, что является одним из механизмов их действия на энергетический обмен и инсулиновую резистентность.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (проект 14-15-00413).

Литература

1. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes / Shpakov A. O., Chistyakova O. V., Derkach K. V., Moyseyuk I. V., Bondareva V. M. // Central Eur. J. Biol.— 2012.— Vol. 7.— P. 33–47.
2. The effect of long-term intranasal serotonin treatment on metabolic parameters and hormonal signaling in rats with high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes / Derkach K. V., Bondareva V. M., Chistyakova O. V., Berstein L. M., Shpakov A. O. // Int. J. Endocrinol.— 2015 — Vol. 2015.— P. 245459.
3. *Сухов И. Б., Деркач К. В., Шпаков А. О.* Сравнительное изучение функциональной активности D2-дофаминергической системы в гипоталамусе крыс с различными моделями сахарного диабета // Журн. эвол. биохимии и физиологии.— 2016.— Т. 52, № 3.— С. 239–241.

ЭФФЕКТЫ СОМАТОТРОПИНА НА ПРОСПЕКТИВНЫЕ ПОТЕНЦИИ К РАЗВИТИЮ *IN VITRO* ООЦИТОВ *BOS TAURUS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА

[1]*Д. Н. Татарская*, [2]*Т. И. Кузьмина*
[1]Международный центр репродуктивной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[2]Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

dnk-21@mail.ru

Введение. Соматотропин играет важную роль в репродуктивной функции млекопитающих. Эксперименты, проведенные на животных с «выключенными» (knockout) генами соматотропина, указывают на снижение фертильности, а у мышей с «выключенными» генами инсулиноподобного фактора роста — 1, медиатора действия соматотропина, развитие фолликулов наблюдается лишь до образования антрума [1]. *In vitro* отмечен положительный эффект соматотропина на созревание ооцитов и развитие доимплантационных эмбрионов *Bos taurus* [2]. Использование красителя BCB (brilliant cresyl blue) позволяет тестировать растущие (BCB^-) и завершившие фазу роста (BCB^+) ооциты. На многих видах животных показана высокая эффективность BCB-тестирования в технологиях получения эмбрионов *in vitro* и клонирования [3, 4]. Alcoba D. с соавторами указали на отсутствие токсичного эффекта BCB при культивировании гранулезы и кумулюса человека [5].

Цель исследования: идентифицировать эффекты рекомбинантного бычьего соматотропина (rBST)

на созревание завершивших фазу роста *in vivo* или *in vitro* ооцитов Bos taurus и оценить потенции к развитию из них доимплантационных эмбрионов.

Материалы и методы. В экспериментах использовали постмортальные яичники *Bos taurus*. Статус ооцита определяли с использованием BCB-теста, основанного на способности BCB (индикатора активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы) выявлять функциональный статус ооцитов (растущие — с неокрашенной ооплазмой, завершившие фазу роста — с окрашенной) [3, 4]. Для проведения BCB-диагностики ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) отмывали в растворе Дюльбекко с 0,4%-м бычьим сывороточным альбумином (Sigma, США). Затем в течении 90 мин инкубировали в 26 мкМ-м растворе BCB (B-5388, Sigma, США) и отмывали в растворе Дюльбекко (Sigma, США). Режимы культивирования и оплодотворения ооцитов, культивирования эмбрионов соответствовали описанным в методических рекомендациях, разработанных в Лаборатории биологии развития ФБГНУ «ВНИИГРЖ» [6]. ОКК культивировали в тканевой среде 199 (TC-199; Sigma, США) с 10%-й фетальной бычьей сывороткой (Sigma, США) и 106 кл/мл гранулезы (контроль), опытную среду дополняли 10 нг/мл rBST (Monsanto, США) [2]. Хроматин исследовали по методу Tarkowski A. [7]. Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4–5 независимых экспериментов оценивали с помощью критерия χ^2.

Результаты и их обсуждение. Наименьшее число ооцитов на стадии метафазы-II обнаружено в группе BCB^--ооцитов, прокультивированных без rBST (49%). Введение в систему дозревания BCB^--ооцитов rBST повышало выход созревших ооцитов (49% (36/74) против 64% (49/76); $p<0,05$). Оплодотворение BCB^+- и BCB^--ооцитов, созревших в средах с и без rBST, выявило высокие потенции к развитию BCB^+-ооцитов. Доля 8–16-клеточных эмбрионов, развившихся из BCB^+-ооцитов, прокультивированных с rBST, составила 77% (115/149), уровень эмбрионов на стадии бластоцисты достиг 39% (58/149), что оказалось значительно выше уровня бластоцист, развившихся из BCB^--ооцитов и прокультивированных без rBST (4% (6/143) против 39% (58/149); $p<0,05$). Добавление rBST вызывало увеличение доли 8–16-клеточных эмбрионов, сформировавшихся после оплодотворения BCB^--ооцитов (49% (70/143) против 60% (84/141); $p<0,05$).

Заключение. При культивировании rBST повышает долю созревших ооцитов, не завершивших фазу роста *in vivo*, увеличивает выход развившихся из них 8–16-клеточных эмбрионов. В результате применения rBST для культивирования завершивших фазу роста *in vivo* ооцитов возрастает выход эмбрионов на стадии бластоцисты (39% против 20%; $p<0,05$). В целом, данные проведенных исследований свидетельствуют о положительном эффекте rBST на мейотическое созревание ооцитов *in vitro*, независимо от их функционального статуса (растущие или завершившие фазу роста), и развитие доимплантанционных эмбрионов.

Литература

1. *Hull K. L., Harvey S.* Growth hormone and reproduction: a review of endocrine and autocrine/paracrine interactions // Int. J. Endocrinol.— 2014.— Vol. 2014.— Art. ID 234014.— 24 p.
2. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on cytoplasmic maturation of bovine oocytes and their developmental competence *in vitro* / Kuzmina T. I., Alm H., Denisenko V., Tuchscherer A., Kanitz W., Torner H. // J. Reprod. Dev.— 2007.— Vol. 53, № 2.— P. 309–316.
3. Selected using BCB staining enhance nuclear reprogramming and the in vivo development of SCNT embryos in cattle / Su J., Wang Y., Li R., Peng H., Hua S., Li Q., Quan F., Guo Z., Zhang Y. // PLoS ONE.— 2012.— Vol. 7, № 4.— e36181.
4. BCB-диагностика донорских ооцитов Bos taurus и Sus scrofa domesticus — перспективы использования в клеточных репродуктивных технологиях / Кузьмина Т. И., Станиславович Т. И., Татарская Д. Н., Мутиева Х. М., Шахтамиров И. Я. // Вопр. норм.-прав. регулирования в ветеринарии.— 2015.— № 2.— С. 212–214.
5. Safety of brilliant cresyl blue staining protocols on human granulosa and cumulus cells / Alcoba D. D., Conzatti M., Ferreira G. D., Pimentel A. M., Kussler A. P., Capp E., von Eye Corleta H., Brum I. S. // Zygote.— 2015.— Vol. 24, № 1.— P. 83–88.
6. Биотехнология получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* / Кузьмина Т. И., Багиров В. А., Егиазарян А. В., Альм Х., Торнер Х.— СПб.— Пушкин, 2009.— 44 с.
7. *Tarkowski A. K.* An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs // Cytogenet. Genome Res.— 1966.— Vol. 5, № 6.— P. 394–400.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СЕРОТОНИНОВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ НА ПОВЕДЕНЧЕСКУЮ АСИММЕТРИЮ АМФИБИЙ

А. С. Трулёв, А. С. Ермаков, Е. Б. Малашичев

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

trulioff@gmail.com

Несмотря на то, что внешне позвоночные животные обладают билатеральной симметрией, расположение и строение их внутренних органов асимметрично. Кроме того, для позвоночных характерна асимметрия функций полушарий головного мозга: правое полушарие отвечает за более быстрые ответы на раздражители, ориентацию в пространстве, агрессию и половое поведение, а левое — за более медленные процессы и сложный анализ.

Латерализация функций головного мозга имеет большое значение для нормальной работы мозга и для поведения. Показано, что некоторые психические заболевания человека, такие как шизофрения, биполярное расстройство, дислексия и аутизм, связаны с нарушениями физиологической межполушарной асимметрии. Вопрос о связи различных асимметрий до сих пор остаётся открытым. В экспериментах на *Danio rerio* показано, что генные каскады, вовлечённые в установление левоправой висцеральной асимметрии (Nodal-каскад), также участвуют в формировании латерализованных структур мозга. Более того, у линии *frequent-situs-inversus* рыб *Danio rerio* (среди мальков которой часто встречаются особи с гетеротаксиями и полным *situs inversus*) транслокация внутренних органов сопровождается изменением некоторых поведенческих асимметрий [1].

Однако до сих пор не была описана асимметричная экспрессия компонентов Nodal-каскада при формировании асимметрии строения головного мозга у млекопитающих или птиц. Кроме того, частота левшей среди людей с *situs inversus* не превышает таковую у людей с обычным расположением внутренних органов [2, 3]. Обследования людей с реверсированным расположением внутренних органов не выявили одновременной инверсии локализации речевых центров из левого полушария переднего мозга в правое; дихотический тест «Dichotic listening test» для исследования слуха также не выявил отличий у группы людей с *situs inversus* от контрольной группы.

Согласно одной из гипотез о механизмах установления асимметрии внутренних органов (висцеральной асимметрии), потеря симметричности происходит на самых ранних этапах развития животного,— на стадии одной-двух клеток. В цитоскелете зиготы уже есть структуры, ориентированные относительно будущих дорзовентральной и переднезадней осей зародыша. Эти структуры определяют направление цитоплазматического транспорта и приводят к асимметричному распределению молекул информационной РНК, кодирующих специфические ионные помпы. Такие помпы являются электрогенными белками, т. е. способствуют порождению ионных токов. Присутствие электрогенных белков на одной из сторон зародыша приводит к появлению электрического потенциала,— образуется электрический градиент и градиент pH вдоль левоправой оси. Градиентное распределение потенциала и pH вдоль левоправой оси поддерживается благодаря тому, что вдоль средней линии на вентральной стороне зародыша клетки смыкаются посредством плотных контактов, образуя своего рода изолятор. При этом возникает ток небольших сигнальных молекул вдоль образовавшегося градиента, и экспрессия определённых генов запускается в результате воздействия данных молекул на клетки одной или противоположной стороны тела. Из литературных данных известно, что одной из таких молекул является серотонин [4]; кроме того, показано, что, действуя на серотониновую сигнализацию на ранних этапах эмбриогенеза амфибий, можно добиться нарушения или инвертирования висцеральной асимметрии [4]. Известно, что белок Mad3 способен связываться с серотонином, после чего, взаимодействуя с белком гистондеацетилазой (HDAC; histone deacetylase), подавлять экспрессию белка XNr-1, деацетилируя гистоны H3 и H4. Белки Mad3 и HDAC равномерно распределены относительно левоправой оси эмбриона, однако, поскольку серотонин аккумулирован в правых вентральных бластомерах, подавление синтеза Nodal происходит именно в них.

В настоящей работе мы, инкубируя развивающихся эмбрионов шпорцевых лягушек в растворах веществ — антагонистов серотониновых рецепторов, добились того, что до 10% зародышей демонстрировали *situs inversus*. В дальнейшем планируется дорастить животных с изменённой асимметрией до метаморфоза, чтобы при помощи поведенческих тестов оценить, не изменяется ли у них поведенческая асимметрия. Впрочем, так как *Xenopus laevis* относится к животным, у которых функциональная латерализация выражена слабо [5], после отработки методики получения шпорцевых лягушек с инвертированной висцеральной асимметрией мы планируем провести аналогичные эксперименты на аксолотлях *Ambystoma mexicanum*, у которых поведенческая асимметрия выражена больше.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00763.

Литература

1. *fsi* Zebrafish show concordant reversal of laterality of viscera, neuroanatomy, and a subset of behavioral responses / Barth K. A., Miklosi A., Watkins J., Bianco I. H., Wilson S. W., Andrew R. J. // Curr. Biol.— 2005.— Vol. 15, № 9.— P. 844–850.
2. *McManus C.* Reversed bodies, reversed brains, and (some) reversed behaviors: of zebrafish and men // Dev. Cell.— 2005.— Vol. 8, № 6.— P. 796–797.
3. *Тростанецкий М. М.* К вопросу о situs viscerum inversus totalis // Бюл. Ин-та им. П. Ф. Лесгафта.— 1924.— Т. 9.— С. 7–24.
4. *Fukumoto T., Kema I. P., Levin M.* Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos // Curr. Biol.— 2005.— Vol. 15, № 9.— P. 794–803.
5. *Malashichev Y. B.* Asymmetries in amphibians: a review of morphology and behaviour // Laterality.— 2002.— Vol. 7, Iss. 3.— P. 197–217.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ С БЕЛКОМ КОМПЛЕМЕНТА C1Q

[1]*Е. С. Умнякова*, [2]*Т. С. Леонова*, [1,2]*М. Н. Берлов*, [1,2]*В. Н. Кокряков*
[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

umka-biolog@mail.ru

Антимикробные пептиды (АМП) — это гетерогенная группа видоспецифичных, низкомолекулярных протеинов, обладающих широким спектром антибиотической активности в отношении различных микроорганизмов.

В настоящее время известно, что функции этих соединений не ограничиваются лишь антимикробным действием. В низких концентрациях АМП являются биологически активными молекулами, которые способны проявлять иммуномодулирующие свойства. В частности, АМП могут взаимодействовать с важнейшим гуморальным компонентом врожденного иммунитета — с системой комплемента.

Система комплемента представляет собой сеть, состоящую из более чем 30 индивидуальных плазменных и мембран-ассоциированных белков, формирующих и регулирующих каскад превращений, которые осуществляются за счет ограниченного протеолиза эндогенными сериновыми протеиназами. Результатом работы каскада комплемента являются: опсонизация патогена с последующей его элиминацией фагоцитами, привлечение макрофагов за счет освобождения анафилатоксинов (C5a, C3a) в очаге реакции и клеточный лизис после формирования мембран-атакующего комплекса (МАК).

Длительная коэволюция и колокализация АМП и комплемента позволяют предположить существование взаимосвязи и тесного взаимодействия между различными компонентами этих систем, что может играть решающую роль в процессе регуляции иммунного ответа со стороны системы комплемента.

В литературе имеются лишь разрозненные и противоречивые сведения о влиянии отдельных АМП на активацию комплемента. В частности, есть данные о связывании АМП с молекулами в составе комплекса C1, ключевого компонента комплемента для запуска по классическому пути, состоящего из рецепторного белка C1q и связанных с ним 4 молекул сериновых протеиназ: по 2 молекулы C1r и C1s.

Известны работы, в которых исследовали взаимодействие α-дефенсинов человека с C1q с ингибированием комплемента [1] и, напротив, с активацией по классическому пути [2]. C1q способен связываться и с β-дефенсинами-1 и -2 человека, ингибируя комплемент по классическому пути, но не инактивируя альтернативный путь [3].

Было показано, что кателицидин протегрин-1 (PG-1) из лейкоцитов свиньи *Sus scrofa domesticus* связывается с комплексом C1 главным образом через комплекс протеиназ и ингибитора C1inh-C1r-C1s, но не через C1q [4]. При этом не изучалась способность C1q связываться с PG-1. Было обнаружено, что пептид тахиплезин из гемоцитов мечехвоста *Tachypleus trindentatus* напрямую взаимодействует с C1q, стимулируя активацию комплемента на поверхности клеток карциномы простаты человека линии TSU [5].

В нашей работе мы проводили изучение взаимодействия антимикробных пептидов ареницина-1 (Ar-1) из целомоцитов пескожила *Arenicola marina* [6] и вышеупомянутого кателицидина свиньи PG-1 [7] с молекулой C1q.

С помощью конъюгата C1q с пероксидазой хрена и иммуноферментного анализа нам удалось выявить комплексы Ar-1 и PG-1 с белком комплемента C1q, которые были стабильны и в условиях высокой ионной силы (0,5 M NaCl). Способность Ar-1 взаимодействовать с C1q сравнима с таковой PG-1. Данные пептиды имеют сходную трехмерную организацию: и Ar-1, и PG-1 образуют антипараллельные β-шпильки, стабилизированные дисульфидными связями. Возможно, подобная структура важна для взаимодействия этих пептидов с белком C1q, поскольку она по своей трехмерной организации сходна с участками CUB-доменов сериновых протеиназ C1r и C1s, связывающихся с коллаген-подобными доменами молекулы C1q. Пептиды, обладающие структурой β-шпильки, могут конкурировать с протеиназами за участки связывания с C1q, таким образом ингибируя активацию комплемента по классическому пути.

Влияние Ar-1 на активацию комплемента оценивали с помощью антитело-зависимого гемолиза эритроцитов барана. Источником комплемента в данном случае служила 5%-я пулированная сыворотка крови здоровых доноров. Обнаружили, что Ar-1 в концентрации 20 мкг/мл полностью подавлял активацию комплемента, а в концентрации 7 мкг/мл подавлял активацию частично. К сожалению, оценить влияние PG-1 на активацию комплемента не удалось из-за чрезвычайно высокой гемолитической активности этого пептида даже в присутствии 5%-й сыворотки.

Мы предполагаем, что Ar-1 может быть использован в качестве регулятора системы комплемента. Существует множество патологических состояний, связанных либо с гипо-, либо с гиперактивацией каскада комплемента, и важно продолжать изучение этого феномена с перспективой создания препарата для лечения последствий дисрегуляции системы комплемента.

Работа поддержана грантом РФФИ для молодых ученых № 16-34-00136.

Литература

1. *Groeneveld T. W. L. et al.* Human neutrophil peptide-1 inhibits both the classical and the lectin pathway of complement activation // Mol. Immunol.— 2007.— Vol. 44. P. 3608–3614.
2. *Prohászka Z. et al.* Defensins purified from human granulocytes bind c1q and activate the classical complement pathway like the transmembrane glycoprotein gp41 of HIV- 1. // Mol. Immunol.— 1997.— Vol. 34.— P. 809–816.

3. *Bhat S., Song Y.-H., Lawyer C., Milner S. M.* Modulation of the complement system by human beta-defensin 2. // J. Burns Wounds.— 2007.— Vol. 5.— e10.
4. Identification of defensin binding to C1 complement / Panyutich A. V, Szold O., Poon P. H., Tseng Y., Ganz T // FEBS Lett.— 1994.— Vol. 356.— P. 169–173.
5. Tachyplesin activates the classic complement pathway to kill tumor cells tachyplesin activates the classic complement pathway to kill tumor cells / Chen J., Xu X., Underhill C. B., Yang S., Wang L. // Cancer Res.— 2005.— Vol. 65. P. 4614–4622.
6. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta Arenicola marina / Ovchinnikova T. V., Aleshina G. M., Balandin S. V., Krasnosdembskaya A. D., Markelov M. L., Frolova E. I., Leonova Y. F., Tagaev A. A., Krasnodembsky E. G., Kokryakov V. N. // FEBS Lett.— 2004.— Vol. 577, (1–2).— P. 209–214.
7. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins / Kokryakov V. N,. Harwig S. S., Panyutich E. A., Shevchenko A. A., Aleshina G. M., Shamova O. V., Korneva H. A., Lehrer R. I. // FEBS Lett.— 1993.— Vol. 327 (2).— P. 231–236.

ЖИВОЙ ЭКВИВАЛЕНТ КОЖИ СТИМУЛИРУЕТ РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОЛНОСЛОЙНЫХ КОЖНЫХ РАН

[1,2]Э. С. Чермных, [1,2]Е. В. Киселева, [1,2]О. С. Роговая, [1,2]Е. А. Воротеляк
[1]Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия
[2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия
elinachermnykh@mail.ru

Введение. Заживление полнослойных ран является одной из важнейших проблем современной медицины. Для их лечения в клинике используют различные раневые покрытия, однако достичь желаемого результата с их помощью не удается. В связи с этим существует необходимость в разработке более эффективных терапевтических средств [1, 2]. Для восстановления кожного покрова целесообразно использование как дермального, так и эпидермального компонента [3].

Цель исследования. Изучить влияние продукта клеточных технологий — «живого эквивалента кожи» (ЖЭК) на регенерацию полнослойной кожной раны.

Материалы и методы. Мы изучили влияние «живого эквивалента кожи» (ЖЭК) на регенерацию полнослойной кожной раны. ЖЭК представляет собой трехмерную структуру, дермальный компонент которой представлен коллагеновым гелем, в который заселены фибробласты кожи, а на поверхности геля культивированы кератиноциты [4]. Для сравнения регенерационной способности ЖЭКа использовали коммерческое раневое покрытие — желатиновая губка Спонгостан (Spongostan, Ethicon). Исследования проводили на 6-ти недельных самцах мышей линии C57Bl/6 в модели шинированной полнослойной кожной раны [5]. Трансплантацию ЖЭК и аппликацию желатиновой губки производили сразу после нанесения раны. Заживление раны исследовали на 6-е и 13-е сутки: иммуноцитохимическим методом оценивали количество пролиферирующих клеток в эпителии и дерме, количество сосудов, клеток воспаления, волосяных фолликулов. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы ANOVA. Различия между значениями оценивали как достоверные при $P<0,05$.

Результаты и их обсуждение. На 6 сутки после нанесения раны в группе Спонгостан количество пролиферирующих эпителиальных клеток в крае раны было в 1,5 раза больше, чем в контрольной и группе ЖЭК. Выявлена миграция эпителиальных клеток по поверхности желатиновой губки. В группе ЖЭК количество пролиферирующих клеток в дерме было в 2,5 и 1,5 раза больше по сравнению с контролем и группой Спонгостан соответственно. Однако значимой разницы в количестве сосудов между экспериментальными группами на этом сроке не выявлено. На 13-е сутки показано, что количество пролиферирующих эпителиальных клеток в центре раны в группе ЖЭК было в 3 раза больше, чем в контроле. В группе ЖЭК количество пролиферирующих клеток в дерме как в краевой зоне, так и в центре раны, было по сравнению с контролем больше в 3,5 и 2 раза, соответственно. Также показано, что в группе ЖЭК количество сосудов в крае раны больше в 4,5 раза, а в центре раны почти в 2 раза по сравнению с контролем. Значимой разницы в количестве сосудов, а также в количестве пролиферирующих кератиноцитов и клеток дермы между контролем и группой Спонгостан не выявлено. Следует отметить, что разницы в количестве клеток воспаления между контролем и экспериментальными группами не выявлено ни на 6-е, ни на 13-е сутки исследования. В отличие от группы Спонгостан в группе ЖЭК показано увеличение количества волосяных фолликулов в крае раны уже на 6 сутки после нанесения раны и было в 5 раз больше, чем в контроле. Также были выявлены различия в эпителизации раны: в группе Спонгостан наблюдали быструю эпителизацию на 6 сутки, однако к 13-м суткам большинство кератиноцитов на поверхности желатиновой губки погибали, что, возможно, связано с деградацией самой губки и нехваткой кровоснабжения. В группе ЖЭК на 13-е сутки рана была практически полностью покрыта многослойным эпителием.

Заключение. Таким образом, в работе показано стимулирующее действие ЖЭК на васкуляризацию раны, пролиферацию клеток, как в эпителии, так и в дерме, что приводит к ускорению регенерации полнослойной кожной раны.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках соглашения о предоставлении субсидии № 14.610.21.0001 (уникальный идентификатор работы RFMEFI61014X0001).

Литература

1. *Ananta M., Brown R. A., Mudera V.* A rapid fabricated living dermal equivalent for skin tissue engineering: an in vivo evaluation in an acute wound model // Tissue Eng. Part A.— 2012.— Vol. 18 (3–4).— P. 353–361.
2. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold / Rustad K. C, Wong V. W., Sorkin M., Glotzbach J. P., Major M. R., Rajadas J., Longaker M. T., Gurtner G. C. // Biomaterials.— 2012.— Vol. 33 (1).— P. 80–90.
3. Use of Clotted Human Plasma and Aprotinin in Skin Tissue Engineering: A Novel Approach to Engineering Composite Skin on a Porous Scaffold / Paul M., Kaur P., Herson M., Cheshire P., Cleland H., Akbarzadeh S. // Tissue Eng. Part C Methods.— 2015.— Vol. 21 (10).— P. 1098–104.
4. Development and use of a living skin equivalent / Bell E., Ehrlich H. P., Sher S., Merrill C., Sarber R., Hull B., Nakatsuji T., Church D., Buttle D. J. // Plast. Reconstr. Surg.— 1981.— Vol. 67 (3).— P. 386–392.
5. *Wang X., Ge J., Tredget E. E., Wu Y.* The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation // Nat. Protoc.— 2013.— Vol. 8 (2).— P. 302–309.

ПОВРЕЖДАЮЩИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ У НОВОРОЖДЕННЫХ ВЫЗЫВАЮТ ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У ВЗРОСЛЫХ САМЦОВ КРЫС

[1]А. С. Шарова, [1]А. В. Протасова, [2]И. П. Буткевич, [2]В. А. Михайленко, [1]Т. Н. Шимараева
[1]Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Россия
[2]Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия
irinabutkevich@yandex.ru

Введение. Повторные болевые и стрессорные воздействия, которым подвергают новорожденных при необходимости лечения в неонатальном центре, вызывают усиленную повторную активацию развивающихся ноцицептивной и стрессорной систем. Отдаленные последствия подобных событий во время неонатального периода, наиболее ранимого к внешним воздействиям, обнаруживаются в дальнейшем в изменении болевой чувствительности, психоэмоционального поведения и реактивности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) [1–3]. Противоречивость имеющихся в литературе данных, а также неизученность механизмов влияния подобных воздействий на функционирование жизненно важных функций организма побуждают к исследованию этой актуальной проблемы. Ранее мы сообщили о вредном влиянии болевого стресса у 1–2-дневных крысят на их адаптивное поведение в препубертатный период развития [4].

Цель исследования: изучение влияний периферического очага воспаления и стресса отнятия от самки у новорожденных крысят на болевую чувствительность и психоэмоциональное поведение этих животных во взрослом состоянии.

Материалы и методы. Самцы крыс линии Вистар в 1-й и повторно во 2-й день жизни (модель недоношенности у человека) были подвергнуты воспалительной боли (Б) (подкожная инъекция 0,5 мкл 2,5%-го раствора формалина в подошву задней конечности), стрессу (С) отнятия от самки на 60 мин (помещение каждого крысенка в отдельный отсек в теплую камеру); контрольные животные — инъекция физиологического раствора (ФР), и интактные. Мы впервые применили в качестве химического провоспалительного агента формалин и оценили его влияние на болевую чувствительность к подобному очагу воспаления у взрослых крыс, а также впервые использовали кратковременный стресс отнятия от самки в отличие от обычно применяемого продолжительного и многодневного стресса. При достижении животными 90–100 дней жизни оценивали болевую чувствительность в условиях созданного очага воспаления в формалиновом тесте, уровень тревожности в тесте приподнятого крестообразного лабиринта и уровень склонности к депрессивноподобному поведению в тесте принудительного плавания.

Результаты и их обсуждение. Обнаружено достоверное усиление болевой чувствительности (увеличение продолжительности болевой реакции вылизывания инъецированной формалином конечности) в формалиновом тесте у взрослых крыс, подвергнутых в новорожденном состоянии как Б, так и С, повышение уровня тревожности у крыс, подвергнутых С, усиление уровня склонности к депрессивноподобному состоянию у животных, испытавших каждое из примененных вредных воздействий. При анализе данных литературы обнаружены значительные различия в долговременном влиянии болевого воздействия у новорожденных на реактивность болевой системы; эти различия определяются типом раздражителя и его интенсивностью как в новорожденный период развития, так и во взрослом состоянии при оценке перинатальных влияний [5]. Например, показано, что сильное перинатальное воздействие вызывает в дальнейшей жизни увеличенный болевой ответ (гипералгезия) и усиленную реактивность ГГНС, тогда как слабое воздействие вызывает гипоалгезию и уменьшенную реактивность ГГНС [6]. Важно, что сходные экспериментальные последствия сильных и слабых ранних повреждений согласуются с клиническими наблюдениями [2, 3]. Имеющиеся данные позволяют

полагать, что гипо- и гиперчувствительный ответы являются выражением общей адаптации, которая сформировалась под влиянием повреждающих воздействий в первые дни жизни. Механизмы влияний болевых и стрессорных повреждающих факторов в первые дни жизни на последующее развитие ЦНС интенсивно обсуждаются.

Заключение. Полученные данные позволяют предполагать, что воспалительная боль и стресс отнятия от матери у новорожденных представляют значительный риск для развития патологий в последующем развитии и указывают на важность контакта с матерью и необходимость применения соответствующего обезболивания в ходе инвазивных процедур у новорожденных.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00106-а.

Литература

1. *Valeri B. O., Holsti L., Linhares M. B.* Neonatal pain and developmental outcomes in children born preterm: a systematic review // Clin. J. Pain.— 2015.— Vol. 31, № 4.— P. 355–362.
2. *Vinall J., Grunau R. E.* Impact of repeated procedural pain-related stress in infants born very preterm // Pediatr. Res.— 2014.— Vol. 75, № 5.— P. 584–587.
3. *Walker S. M., Beggs S., Baccei M. L.* Persistent changes in peripheral and spinal nociceptive processing after early tissue injury // Exp. Neurology.— 2016 — Vol. 275, Pt. 2.— P. 253–260.
4. *Буткевич И. П., Михайленко В. А., Лаврова Ю. А., Уланова Н. А.* Повторный болевой синдром при воспалении у новорожденных самцов изменяет адаптивное поведение в адолесцентный период развития // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.— 2014.— Т. 100, № 11.— С. 1241–1251.
5. *Victoria N. C., Murphy A. Z.* The long-term impact of early life pain on adult responses to anxiety and stress: Historical perspectives and empirical evidence // Dev. Neurobiol.— 2016 — Vol. 37, Pt. 2.— P. 1–13.
6. *Schwaller F., Fitzgerald M.* The consequences of pain in early life: injury-induced plasticity in developing pain pathways // Eur. J. Neurosci.— 2014 — Vol. 39, № 3.— P. 344–355.

ФИБРОБЛАСТЫ КОЖИ ЗАРОДЫШЕЙ И ИХ УЧАСТИЕ В РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНЫХ РАН И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

О. Н. Шевелева, С. Г. Рамазанова, О. В. Паюшина, . Н. Буторина
Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия

on_sheveleva@mail.ru

Введение. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) — это гетерогенная популяция тканеспецефических стволовых и родоначальных клеток, которые характеризуются адгезией к пластику, экспрессией маркеров CD73, CD90, CD105, при отсутствии кроветворных маркеров, и потенциями к остео-, адипо- и хондрогенезу [1]. Широкое распространение МСК, их способность циркулировать в крови, а также наличие у них рецепторов к воспалительным факторам [2, 3] указывают на особую роль, которую эти клетки играют в функционировании различных тканей и их репарации. МСК являются ключевым компонентом микроокружения практически всех тканей и регулируют выживание, пролиферацию и дифференцировку резидентных клеток, поддерживая тканевой гомеостаз [4]. Сравнительное исследование МСК из разных источников является важной общебиологической и практической задачей. Настоящее исследование направлено на изучение свойств фибробластов кожи зародышей крысы, присутствия среди них МСК и их регенераторного потенциала в сравнении с МСК из костного мозга половозрелых животных, как наиболее изученных и соответствующих критериям МСК.

Материалы и методы. В первой части работы были проведены *in vitro* эксперименты по оценке содержания МСК в коже 20-суточных зародышей крысы. Была изучена экспрессия основных маркеров МСК (CD73, CD90), остеогенные и адипогенные потенции выделенных клеток. Для оценки изначальных остеогенных потенций фибробластоподобных клеток в колониях проводили окрашивание на ранний маркер остеогенной дифференцировки — щелочную фосфатазу. Полученные данные сравнивали с данными для МСК костного мозга. Затем были проведены *in vitro* эксперименты по культивированию мышечных клеток в среде, кондиционированной кожными фибробластами (2-го пассажа), для оценки паракринного влияния последних на миогенез. Параллельно были проведены аналогичные эксперименты для МСК костного мозга. Результаты оценивали по числу образующихся миотуб в обеих культурах. Во второй части работы были проведены *in vivo* эксперименты по изучению влияния кожных фибробластов и МСК костного мозга, а так же кондиционированных ими сред, на регенерацию мышц конечностей после глубокого механического повреждения и на регенерацию кожной раны. Фиксация производилась на 14-е сутки после повреждения.

В результате экспериментов *in vitro* были получены следующие данные:

1. Количество колоний фибробластоподобных клеток в первичной культуре клеток кожи зародышей превышало количество колоний в культуре стромальных клеток костного мозга, однако, клеток, окрашенных на щелочную фосфатазу было существенно меньше.

2. В культурах кожных фибробластов CD73 экпрессировали единичные клетки и меньше 50% клеток экспрессировали CD90, тогда как в культурах клеток костного мозга большинство клеток были позитивны на эти маркеры МСК.

3. Культивирование в индукционных средах, содержащих индукторы остеогенной или адипогенной дифференцировки, показало, что фибробласты кожи имеют слабые остеогенные и адипогенные потенции по сравнению с МСК костного мозга.

4. При культивировании мышечных клеток в кондиционированной среде от кожных фибробластов или МСК костного мозга 2-го пассажа происходила стимуляция миогенной дифференцировки и в том, и в другом случае. Возрастала скорость образования и количество миотуб по сравнению с контролем, средой DMEM с 10% FCS.

В экспериментах *in vivo* было показано, что МСК костного мозга усиливают васкуляризацию кожных ран, на эпителизацию не влияют либо подавляют ее. Кондиционированная ими среда уменьшает воспаление или усиливает эпителизацию, при многократном введении выявляется ее стимулирующее влияние на васкуляризацию (на фоне замедления регенерации). Фибробласты кожи зародышей действуют подобно МСК костного мозга (усиливают васкуляризацию и несколько замедляют эпителизацию), но только при введении большого количества клеток. Кондиционированная ими среда на заживление ран не влияет. На модели повреждения скелетных мышц введение фибробластов кожи усиливало и пролонгировало воспаление, тогда как введение МСК костного мозга или свежевыделенной суспензии клеток из костного мозга, напротив, воспаление подавляло. Однократное введение кондиционированной среды от фибробластов кожи или МСК костного мозга существенного эффекта на регенерацию мышц не оказывало.

Выводы. Таким образом, в коже зародышей содержатся клетки, обладающие свойствами МСК, однако, по-видимому, в существенно меньшем количестве, чем в костном мозге половозрелых животных. *In vitro*, благодаря своему паракринному действию, они способны усиливать миогенез. Однако в опытах *in vivo* фибробласты кожи или среда от них такого эффекта, как клетки костного мозга, не оказывают. Вероятно, это связано с меньшим содержанием МСК в популяции кожных фибробластов.

Литература

1. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / Dominici M., Le Blanc K., Mueller.I, Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. // Cytotherapy.— 2006.— Vol. 8 (4).— P. 315–317.
2. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells / Newman R. E., Yoo D., LeRoux M. A., Danilkovitch-Miagkova A. // Inflamm Allergy Drug Targets.— 2009.— Vol. 8 (2).— P. 110–123.
3. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors / Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. // Science.— 1998.— Vol. 279 (5356) — P. 1528–1530.
4. *Caplan A. I.* Why are MSCs therapeutic? New data: new insight // J. Pathol.— 2009.— Vol. 217 (2).— P. 318–324.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ АЦИЛИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ ПЕПТИДА 562–572 РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

[1]Е. А. Шпакова, [1]В. Н. Сорокоумов, [1]А. В. Акентьев, [2]К. В. Деркач, [1,2]А. О. Шпаков

[1]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

[2]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

eshpakova@mail.ru

Введение. Пептиды, соответствующие цитоплазматическим участкам G-белок-сопряженных рецепторов (GPCR), влияют на их активность и модулируют передачу через них гормонального сигнала. Важную роль здесь играет модификация GPCR-пептидов гидрофобными радикалами, которые позволяют им заякориваться в мембране и проникать через нее к внутриклеточным мишеням [1]. Ацилированные остатками жирных кислот GPCR-пептиды по активности превосходят немодифицированные аналоги [1, 2]. Ранее нами было показано, что ацилированные пептиды, соответствующие участку 562–572 рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР), активируют фермент аденилатциклазу (АЦ) в репродуктивных тканях крыс, и их эффекты специфичны в отношении ЛГР [3]. Наиболее активным был пептид, модифицированный с С-конца пальмитатом, в то время как модификация деканоатом была менее эффективна. Пептиды, ацилированные с N-конца, были неактивными. Неожиданный результат был получен для пептида, модифицированного деканоатами с обоих концов. В концентрации 10^{-5} М он оказывал максимальный стимулирующий эффект на АЦ, но при ее повышении до 10^{-3} М его эффект снижался. Мы предположили, что это связано с особенностями его физико-химических свойств. Для проверки этого у пептида 562–572, содержащего два остатка деканоата, исследовали гидрофобность и способность к мицеллообразованию. Для сравнения изучали его аналоги, модифицированные одним остатком деканоата или пальмитата. Сопоставляли физико-химические параметры изучаемых пептидов с их биологической активностью по влиянию на активность АЦ в семенниках и яичниках крыс.

Материалы и методы исследования. Пептиды синтезировали твердофазным методом, как описано ранее [3]. Всего были синтезированы один немодифицированный и 5 модифицированных пальмитатом (Palm) или деканоатом (Dec) пептидов, соответствующих участку 562–572 ЛГР крысы: Asn-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Lys-Nle-Ala$^{562-572}$ (I), [562–572, Lys^{563}(Dec)]-Lys-Ala (II), [562–572]-Lys(Dec)-Ala (III), [562–572, Lys^{563}(Dec)]-Lys(Dec)-Ala (IV), [562–572, Lys^{563}(Palm)]-Lys-Ala (V), [562–572]-Lys(Palm)-Ala (VI). Структуру ацилированных пептидов подтверждали с помощью масс-спектрометрии. Выделение плазматических мембран и определение в них активности АЦ проводили, как описано ранее [2, 3]. Статистический анализ проводили с использованием программы ANOVA. Данные представлены в виде $M \pm SD$, различия оценивали как достоверные при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Пептид VI в наибольшей степени активировал АЦ, его эффект достигал максимума в концентрации 10^{-4} М и далее не менялся. АЦ эффект пептида IV, модифицированного двумя деканоатами, в концентрации 10^{-5} М уступал таковому пептида VI, но превосходил АЦ эффекты других пептидов. При повышении концентрации отмечали ослабление АЦ эффекта пептида IV, причем в концентрации 10^{-3} М он был ниже, чем для пептида III с С-концевым деканоатом. Эти закономерности были выявлены как в семенниках, так и в яичниках.

Порядок элюирования ацилированных аналогов пептида 562–572 с обращенно-фазовой колонки Nucleosil C8 был следующим: IV<II<III<V<VI. Эти данные хорошо согласуется с рядом элюирования, построенным на основе расчета гидрофобности с помощью программы ProtParam (II<III<VI<V<IV). Исключение составил пептид IV с аномально низким временем удерживания. Оно было ниже, чем для немодифицированного пептида (t_R=13,2 мин, k'=1,93) с очень низкой гидрофобностью. Такое расхождение может быть обусловлено ослаблением взаимодействия пептида IV с гидрофобной фазой колонки. Наиболее вероятной причиной этого является мицеллообразование. Для проверки этого изучали элюирование пептида IV в том же градиентном режиме, но при повышенном содержании трифторуксусной кислоты (ТФУК) (0,5%). Повышение концентрации ТФУК приводит к разрушению вторичной и третичной структур пептидов и предотвращает образование ими мицелл. При повышении концентрации ТФУК время удерживания пептида IV увеличивалось с 6,7 до 21,8 мин, в то время как время удерживания других пептидов либо немного снижалось, либо не менялось. Показано также, что поверхностное натяжение водного раствора пептида IV, которое оценивали по величине критической концентрации мицеллообразования, с увеличением концентрации пептида до 10^{-5} М плавно снижалось, затем отмечался его резкий скачок вниз и выход на плато.

Выводы. Таким образом, пептид IV в концентрации выше 10^{-5} М образует мицеллоподобные структуры, что приводит к снижению его стимулирующего эффекта на активность АЦ. Полученные данные свидетельствуют о том, что образование межмолекулярных комплексов между GPCR-пептидами, модифицированными гидрофобными радикалами, может существенно влиять на их биологическую активность как *in vitro*, так и *in vivo*, и это необходимо учитывать при разработке их новых мембранно-активных аналогов.

Литература

1. *Шпаков А. О., Шпакова Е. А.* Перспективы применения в медицине пептидов и их производных, структурно соответствующих сопряженным с G-белками рецепторам // Биомедицинская химия.— 2015.— Т. 61, вып. 1.— С. 19–29.
2. *Derkach K. V., Shpakova E. A., Titov A. M., Shpakov A. O.* Intranasal and intramuscular administration of lysine-palmitoylated peptide 612–627 of thyroid-stimulating hormone receptor increases the level of thyroid hormones in rats // Int. J. Pept. Res. Ther.— 2015.— Vol. 21.— P. 249–260.
3. *Шпакова Е. А., Деркач К. В., Шпаков А. О.* Биологическая активность липофильных производных пептида 562–572 рецептора лютеинизирующего гормона крысы // Докл. Академии наук.— 2013.— Т. 452, № 4.— С. 453–456.

СТИМУЛЯЦИЯ С-КОНЦЕВЫМИ ФРАГМЕНТАМИ С-ПЕПТИДА АКТИВНОСТИ ГЕТЕРОТРИМЕРНЫХ G-БЕЛКОВ, СУБСТРАТОВ КОКЛЮШНОГО ТОКСИНА

[1]*Е. А. Шпакова*, [2]*К. В. Деркач*, [1]*В. Н. Сорокоумов*, [1,2]*А. О. Шпаков*

[1]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

[2]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

eshpakova@mail.ru

Введение. С-пептид, продукт протеолиза проинсулина, используется не только для оценки продукции инсулина β-клетками, но и сам наделен сигнальными функциями. Его мишенями являются фосфатидилинозитол-3-киназа, Akt-киназа, эндотелиальная NO-синтаза, а также чувствительные к коклюшному токсину (КТ) гетеротримерные $G_{i/o}$-белки. В 2013 г. был идентифицирован рецептор для С-пептида — GPR146 [1]. Проведенный нами структурный анализ показал, что GPR146 гомологичен рецепторам, сопряженным с $G_{i/o}$- и $G_{q/11}$-белками. Поскольку мишенью $G_{i/o}$-сопряженных рецепторов является фермент аденилатциклаза

(АЦ), то было высказано предположение, что С-пептид и его С-концевые фрагменты, которые обладают сигнальными свойствами, сходными с таковыми полноразмерного С-пептида, влияют на активность АЦ.

Цель работы состояла в изучении влияния С-пептида и его С-концевых пентапептидов на активность АЦ и ГТФ-связывающую способность G-белков в плазматических мембранах мозга и миокарда крыс.

Материалы и методы исследования. Выделение плазматических мембран, определение в них активности АЦ и ГТФ-связывания G-белков, АДФ-рибозилирование с помощью КТ и холерного токсина (ХТ) проводили, как описано ранее [2, 3]. Для определения активности АЦ и ГТФ-связывания использовали [α-^{32}P]АТФ (1000 Ки/ммоль) («Изотоп», Россия) и β,γ-имидо[8-^{3}H]-гуанозин-5'-трифосфат ([8-^{3}H]-GppNHp) (5 Ки/ммоль) («Amersham», Англия). Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка, ГТФ-связывание — в пмоль [8-^{3}H]-GppNHp на 1 мг мембранного белка. Пептиды EGSLQ и EVARQ, соответствующие С-концевым участкам 27–31 С-пептида человека и крысы, синтезировали твердофазным методом. Их структуру подтверждали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения. Статистический анализ проводили с использованием программы ANOVA. Данные представлены в виде M±SD, различия оценивали как достоверные при $p<0,05$.

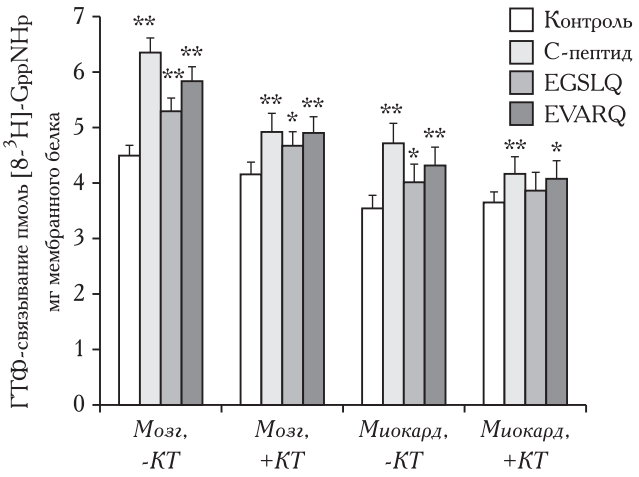


Рисунок. Влияние С-пептида (10–7 М) и пептидов EGSLQ и EVARQ (10–5 М) на уровень ГТФ-связывания в контрольных и обработанных коклюшным токсином мембранах, выделенных из мозга и миокарда крыс. Значения представлены, как M±SD (n=6). * и ** — различия с контролем достоверны при $P<0,05$ и $P<0,001$, соответственно.

Результаты и их обсуждение. В концентрациях от 10^{-9} М (физиологические) до 10^{-7} М С-пептид не влиял на базальную активность АЦ и на стимулирующий АЦ эффект форсколина и GppNHp (10^{-5} М) в плазматических мембранах мозга и миокарда. Пептиды EGSLQ и EVARQ (10^{-7}–10^{-5} М) также не влияли на базальную и стимулированную негормональными агентами активность АЦ. При этом С-пептид (10^{-7} М) и пентапептиды EGSLQ и EVARQ (10^{-5} М) повышали базальный уровень ГТФ-связывания, причем эффект С-пептида превосходил таковые пентапептидов (рис.). Пептид EVARQ, соответствующий С-концевому сегменту С-пептида крысы, был активнее пептида EGSLQ, соответствующего С-пептиду человека. Преинкубация мембран с КТ частично ингибировала стимулирующие эффекты С-пептида и пентапептидов (рис.). В мембранах мозга, обработанных КТ, эффекты С-пептида, EGSLQ и EVARQ составили 42, 64 и 56% от таковых в контрольных мембранах. В мембранах миокарда, обработанных КТ, эти эффекты составили 43, 42 и 54% от таковых в контроле. Эти данные указывают на то, что С-пептид и его С-концевые фрагменты стимулируют ГТФ-связывание как чувствительных к КТ $G_{i/o}$-белков, так и нечувствительных к нему $G_{q/11}$- и G_s-белков. Однако преинкубация с ХТ, инактивирующим G_s-белки, не влияла на стимулирующие эффекты С-пептида и пентапептидов на ГТФ-связывание. Следовательно, мишенями С-пептида и С-концевых пентапептидов являются чувствительные к КТ $G_{i/o}$-белки и нечувствительные к КТ $G_{q/11}$-белки.

Таким образом, С-пептид и его фрагменты, EGSLQ и EVARQ, не влияют на активность АЦ в плазматических мембранах мозга и миокарда крыс. Их мишенями являются гетеротримерные $G_{i/o}$- и $G_{q/11}$-белки. Это согласуется с данными о том, что С-пептид и его С-концевые фрагменты активируют фосфолипазу Сβ, регулируемую $\beta\gamma$-димером ($G_{i/o}$-белки) и $\alpha_{q/11}$-субъединицей ($G_{q/11}$-белки), а также стимулируют фосфатидилинозитол-3-киназу, сопряженную с рецепторами через $\beta\gamma$-димеры $G_{i/o}$-белков.

Работа поддержана средствами НИР 12.38.220.2015 (Санкт-Петербургский государственный университет).

Литература

1. *Yosten G. L., Kolar G. R., Redlinger L. J., Samson W. K.* Evidence for an interaction between proinsulin C-peptide and GPR146 // J. Endocrinol.— 2013.— Vol. 218.— P. 1–8.
2. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes / Shpakov A. O., Chistyakova O. V., Derkach K. V., Moiseyuk I. V., Bondareva V. M. // Central Eur. J. Biol.— 2012.— Vol. 7.— P. 33–47.
3. The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system / Shpakov A. O., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. V., Vlasov G. P. // Int. J. Pept. Res. Ther.— 2010.— Vol. 16.— P. 95–105.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

1. Статьи для публикации должны быть написаны на русском языке, иметь реферат (резюме), ключевые слова (3–4) на русском и английском языках.

2. Статьи представляются в редакцию на электронных и бумажных носителях. Если у автора есть затруднения с пересылкой статьи по почте, предоставление материала возможно в электронном виде. Все страницы должны быть пронумерованы от первой до последней страницы, без пропусков и литерных добавлений (например, 2а и т. п.).

3. Объем статьи не должен превышать:

3.1. Передовая статья, обзор, лекция — 25 страниц;

3.2. Оригинальная статья — 15 страниц;

3.3. Рекомендации для врачей — 5 страниц;

3.4. Рецензии, информация, хроника — 3 страницы.

4. Статья должна иметь следующие разделы.

4.1. Титульный лист — указываются название статьи, инициалы и фамилии авторов, полное название учреждения, город на русском и английском языках. Титульный лист должен быть подписан всеми авторами.

4.2. Резюме — до 1500 знаков, отражает цель, основные методы исследований, важнейшие результаты.

4.3. Основной текст должен включать в себя следующие разделы, расположенные в установленном порядке:

4.3.1. Введение;

4.3.2. Материалы и методы исследования — обязательно указываются сведения о статистической обработке экспериментального или клинического материала;

4.3.3. Результаты и их обсуждение;

4.3.4. Выводы;

4.3.5. Литература не более 25 источников для оригинальной статьи и 75 для обзора.

5. Каждая таблица должна иметь номер и название. Рисунки, графики, схемы должны быть черно-белыми с различимой штриховкой, выполнены в электронном (отдельными файлами с сохранением возможности редактирования) и бумажном вариантах отдельно от текста, а также иметь подрисуночные подписи без сокращений и дублироваться в тексте. При включении в публикацию растровой графики (сканированных, цифровых снимков, снимков с экрана мониторов и т. п.) предпочтение отдается рисункам с размером меньшей стороны не менее 5 см (640 пикселей), в форматах pdf, tiff, jpeg (максимальное качество).

6. Библиографический список.

6.1. Библиографические описания источников располагают в порядке упоминания их в тексте статьи и нумеруют арабскими цифрами.

6.2. В лекции можно давать список рекомендуемой литературы, и тогда в тексте ссылаться на источники не обязательно.

6.3. Библиографический список оформляют в соответствии с действующим ГОСТом, указываются все авторы цитируемых работ.

6.4. Ссылки на цитируемые работы в тексте дают в виде порядковых номеров, заключенных в квадратные скобки. Не следует включать в список литературы диссертации.

6.5. Примеры:

1. *Ткаченко Б. И.* Физиология человека.— СПб.: Наука, 2000.— 400 с.
2. *Шабанов П. Д.* Механизмы лекарственной зависимости // Мед. акад. вестн.— 2001.— Т. I, № 1.— С. 27–35.
3. *Лебедев А. А.* Поведенческие эффекты алаптида у крыс-изолянтов // Эмоциональное поведение / Под ред. Е. С. Петрова.— СПб.: Питер, 2000.— С. 56–78.

7. Данные об авторах статьи должны включать следующие сведения: фамилия, имя, отчество, место работы с указанием города и страны, адрес для переписки и номер телефона для связи, e-mail.

8. Все термины, употребляемые в статье, должны строго соответствовать действующим номенклатурам (анатомической, гистологической и др.), названия лекарственных средств — Государственной Фармакопее, единицы физических величин — системе единиц СИ.

9. Статьи, поступившие в редакцию, обязательно рецензируются. Если у рецензента возникают вопросы, статья возвращается на доработку. Датой поступления статьи считается дата получения редакцией окончательного варианта статьи. Редакция оставляет за собой право внесения редакторских изменений в текст, не искажающих смысла статьи.

10. Авторское право на конкретную статью принадлежит авторам статьи, что отмечается знаком ©. За издательством остается право на оформление, издание, распространение и доведение до всеобщего сведения публикаций, а также включение журнала в различные базы данных и информационные системы. При перепечатке статьи или ее части ссылка па журнал обязательна.

11. Редакция высылает авторам 1 копию журнала, в котором опубликована статья.

12. Редакция не выплачивает гонорара за статьи и не взимает плату за опубликование рукописей.

13. Журнал публикует рекламу по профилю журнала в виде отдельных рекламных модулей, статей, содержащих коммерческую информацию по профилю журнала с указанием «Публикуется на правах рекламы». Размещение рекламы в журнале платное. Объем помещения рекламной информации в журнале ограничен.

14. Материалы следует направлять ответственному секретарю Александру Валентиновичу Дмитриеву. Адрес: Санкт-Петербург, 197022, Каменноостровский пр., д. 71, СЗО РАМН, электронная почта: *medicalacfdemicjournal@gmail.com*, *admitriev10@yandex.ru*.

Мы рады всем Вашим статьям, представленным в наш журнал!

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов опубликованных материалов.

Редакция не несет ответственности за последствия, связанные с неправильным использованием информации.

Журнал выпущен при поддержке:

alpha mobili helicon LabTech

Медицинский академический журнал

Свидетельство о регистрации: ПИ № 2-4952 от 17.01.2001 г.

Редактор: Т. В. Руксина

Верстка: К. К. Ершов

Подписано в печать 11.09.16 г. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 31. Тираж 1000 экз.

Отпечатано в типографии: ООО «РИП СПБ», Санкт-Петербург, пер. Дмитровский, д. 7, лит. А, пом. 6-Н.

LabTech

АВТОРИЗОВАННЫЙ ДИЛЕР КОМПАНИИ BECKMAN COULTER INT. S.A.

BECKMAN COULTER

- Биохимические анализаторы
- Гематологические анализаторы
- Иммунохимические анализаторы
- Микробиологические анализаторы
- Анализаторы мочи
- Проточные цитофлуориметры
- Центрифуги
- Лабораторные роботы

IL Werfen

АВТОРИЗОВАННЫЙ ДИЛЕР КОМПАНИИ INSTRUMENTATION LABORATORY

- Анализаторы газов крови и электролитов
- Анализаторы для исследования системы гемостаза
- Реагенты для коагулометрии

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ КОМПАНИИ SARSTEDT

SARSTEDT

- Системы взятия венозной крови S-Monovette
- Системы взятия капиллярной крови Microvette
- Контейнеры для биологических образцов
- Пробирки
- Расходные материалы для: микробиологии, ПЦР-диагностики, культивирования клеток
- Наконечники для автоматических пипеток

ООО «ЛабТэк Лтд»
191186, г. Санкт-Петербург, а/я 238
Тел.: (812) 313-0203, факс: (812) 313-0204
www.labtech.su / labtech@labtech.su