

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

Сборник научных трудов
XVI Международной конференции студентов, аспирантов
и молодых ученых
23–26 апреля 2019 г.

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

Volume 4. Biology and Fundamental Medicine

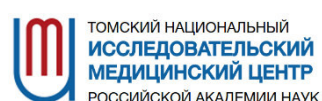
Abstracts

XVI International Conference of students, graduate students
and young scientists

April 23–26, 2019



Национальный
исследовательский
**Томский
государственный
университет**



Томск 2019

УДК 501:004(063)

ББК 72:32.81л0

П27

П27 **Перспективы развития фундаментальных наук** : сборник трудов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Томск, 23–26 апреля 2019 г.). В 7 томах. Том 4. Биология и фундаментальная медицина / под ред. И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2019. – 150 с.

ISBN 978-5-4387-0886-5 (т. 4)

ISBN 978-5-4387-0882-7

Сборник содержит труды участников XVI Международной конференции «Перспективы развития фундаментальных наук», представленные на секции «Биология и фундаментальная медицина».

Представлены доклады в области анатомии и физиологии, иммунологии, неврологии и психиатрии, клеточной биологии и гистологии, генетики, биохимии и молекулярной биологии, микробиологии и вирусологии, биофизики, биотехнологии, биоинженерии, фармакологии и фармакогнозии, кибернетики и биоинформатики, а также биоматериалов: исследований *in vitro* и *in vivo*.

УДК 501:004 063)

ББК 72:32.81л0

Редакционная коллегия

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

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

С. А. Поробова.

ISBN 978-5-4387-0886-5 (т. 4)

ISBN 978-5-4387-0882-7

© ФГАОУ ВО НИ ТПУ, 2019



Национальный
исследовательский
Томский
государственный
университет

АВТОНОМНАЯ МАГИСТЕРСКАЯ ПРОГРАММА «ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ И БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ»



Химический
факультет



САЕ Институт («Умные
материалы и технологии»)

Направление подготовки
Факультет
Форма обучения

Химия
Химический факультет
Очная с элементами
дистанционного обучения
2 года
Русский
10

Продолжительность программы
Язык обучения
Бюджетные места

Условия приёма

Приём на первый курс магистратуры проводится на конкурсной основе по заявлениям лиц, имеющих высшее образование (бакалавриат или специалитет) по результатам вступительных испытаний.

Вступительные испытания: экзамен по химии, собеседование.

Магистерская программа включает возможность обучения по программе двойного диплома совместно с университетом Chemie Paris Tech (Франция). На 2-м курсе обучение осуществляется на площадках Chemie Paris Tech. За период обучения по одной программе магистратуры возможно получить дипломы двух Университетов, углублено освоить курсы химической технологии и инженерии материалов.

КЛЮЧЕВЫЕ ДИСЦИПЛИНЫ ПРОГРАММЫ

Основы общей
иммунологии

Введение в медицинскую
биологическую химию

Молекулярные методы
в биомедицинских
исследованиях

Элементы физической
химии в процессах
жизнедеятельности

Основы клеточной
биологии
и диагностики клеточных
систем

Химические технологии
в медицине.
Биоматериаловедение

Молекулярная онкология

Основы метрологии, стандартизации и сертификации в области разработки и производства фармацевтических субстанций и биомедицинских материалов

Магистратура «Трансляционные химические и биомедицинские технологии» – ЭТО:

- междисциплинарные знания на стыке химии, биологии, фармакологии, клеточной и молекулярной биомедицины
- компетенции по проведению доклинических и клинических испытаний, разработка технологического регламента, сертификации, маркетингу и малотоннажному производству продукта

- стажировки в ведущих мировых университетах
- диплом международного уровня
- работа с новыми технологиями
- освоение полного цикла получения продукта: синтез-исследование, доклинические исследования, сертификация, маркетинг

КОНТАКТЫ

Менеджер программы: **Шаповалова Елена**, +7 (953) 928 15 49, elenas6691@gmail.com
Заявки оставляйте на сайте: smil.tsu.ru/ru



ПРЕИМУЩЕСТВА ПРОГРАММЫ



Обучение современным химическим и биомедицинским технологиям осуществляется на базе научных центров ТГУ, г. Томска, университетов Гейдельберга и Мюнстера (Германия)



Ведущие зарубежные и российские специалисты



Индивидуальная образовательная траектория



Более 30% учебных дисциплин составляют курсы по выбору



Востребованность специалистов по трансляционным химическим и биомедицинским технологиям

ВЕДУЩИЕ ПРЕПОДАВАТЕЛИ



Курзина Ирина Александровна
Руководитель магистерской программы:

д.ф.м.н., доцент, профессор кафедры физической и коллоидной химии ХФ ТГУ, зам. заведующего лабораторией трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, Томск, Россия.



Кжышковская Юлия Георгиевна
Соруководитель магистерской программы:

д.б.н., профессор, зав. лабораторией трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, Томск, Россия. Университет Гейдельберга, Медицинский факультет, Заведующая Отделом Врожденного Иммуитета и Иммунологической Толерантности Института Трансфузионной Медицины и Иммунологии, Маннгейм, Германия.



Рябов Вячеслав Валерьевич

д.м.н., заместитель директора по научной и лечебной работе НИИ кардиологии Томского НИМЦ, ведущий научный сотрудник лаборатории трансляционной и клеточной биомедицины НИ ТГУ.



Журина Елена Георгиевна

д.м.н., профессор кафедры органической химии ХФ ТГУ, врач иммунолог-аллерголог, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ, член российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов, Томск, Россия.



Хайнрих Лотар Альфред

д.х.н., в.н.с. лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины НИ ТГУ, Томск, Россия. President of marcotech oHG, Honorary professor of the Westphalian Wilhelms University, Muenster. Руководитель блока инновационных материалов для регенеративной медицины, Мюнстер, Германия



- Тестирование
- 4 курс
- Бакалавриат
- 1 и 2 семестры
- TSU
- 3 и 4 семестры
- Chimie ParisTech
- 5 семестр
- СnPT
- стажировка
- 6 семестр
- Защита
- 2 диплома
- (TSU, Chimie ParisTech)



Chimie ParisTech + TSU
 Междисциплинарная
 магистерская программа
 двойного диплома



ТВОЯ
 образовательная
 траектория

**«Трансляционные химические
 и биомедицинские технологии»**



Chimie ParisTech (Франция) - французская высшая школа, член объединения ParisTech. Престижное образование в направлении химической технологии

Направление подготовки:
 техническое

Условия участия:

1. Средний балл успеваемости не ниже 4.5
2. Рекомендация декана факультета/научного руководителя
3. Уровень английского/французского языка не ниже upper-intermediate.

Форма обучения: очная

Продолжительность программы: 3 года

Язык обучения: французский, английский

При успешном окончании программы двойного диплома, студенты Chimie ParisTech дополнительно получают степень магистра в ТГУ, а студенты ТГУ дополнительно получают степень «Diplôme d'Ingénieur de Chimie ParisTech» в Chimie ParisTech (соответствует степени магистра в области инженерных наук).

WWW: <http://smti.tsu.ru/ru/diplome-dingénieur-de-chimie-paristech/>
 Телефон: + 7 (3822) 78 56 21
 E-mail: gulnara.voronova@gmail.com

СОДЕРЖАНИЕ

АДСОРБЕНТЫ – ИХ РОЛЬ В ЭКОЛОГИИ И КАТАЛИЗЕ С.И. Решетников	8
КАТАЛИТИЧЕСКАЯ КОРРОЗИЯ ПЛАТИНОВЫХ МЕТАЛЛОВ, ИНИЦИИРОВАННАЯ РЕАКЦИЯМИ ОКИСЛЕНИЯ СО И NH ₃ КИСЛОРОДОМ А.Н. Саланов	9
ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ НА ПРОРАСТАНИЕ ЗЕРЕН ПШЕНИЦЫ К.Т. Муханбетжанова	10
АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ У СИРИЙСКОГО ХОМЯЧКА (MESOCRISSETUS AURATUS): ВЛИЯНИЕ СВЕТОВОГО РЕЖИМА СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИИ И ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА П.А. Астафьева, А.В. Морозов, Е.П. Антонова	13
ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ МОЗГОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА И АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ А.С. Бойко	16
СВЯЗЬ УРОВНЯ КОРТИКОСТЕРОНА И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МИКРОВОЛНОВЫХ ИМПУЛЬСОВ А.В. Васильев, А.А. Гороховский	19
ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТЕОГЕННОЙ ИНДУКЦИИ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОБРАБОТКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СУСПЕНЗИЕЙ, СОДЕРЖАЩЕЙ ФАКТОРЫ РОСТА КЛЕТОЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С.А. Васильев, Р.Р. Савченко, Е.Г. Шаповалова	22
ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА И СВЕТОВОГО РЕЖИМА СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИИ НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ОРГАНОВ СИРИЙСКОГО ХОМЯЧКА А.Д. Володина, А.В. Морозов, Е.П. Антонова	25
КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ХРОНИЧЕСКОЙ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ Н.С. Воронков, С.Ю. Цибульников	28
ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРА ДОФАМИНА-D2 (DRD2) И DISC1 С ШИЗОФРЕНИЕЙ А.А. Глухова, И.В. Пожидаев	31
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ОРБИТАЛЬНОЙ КУЛЬТИ <i>IN VIVO</i> Е.А. Горбунова, Е.О. Филиппова	34
ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИОКАРДА И АКТИВНОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ КАРДИОСКЛЕРОЗА У КРЫС А.А. Гороховский, А.В. Васильев	37
СНА-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЛАНДШАФТ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СЛУЧАЯХ ФЕНОМЕНА ГЕНЕТИЧЕСКОГО «ЗАМИРАНИЯ» ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ И.В. Дерюшева, М.М.Цыганов, М.К.Ибрагимова	40
ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ВЫБОРКЕ БОЛЬНЫХ ЗАПАДНО-СИБИРСКОГО РЕГИОНА Е.Г. Ефимова, А.О. Дегтярева, К.И. Погодаева	43
РОЛЬ ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Е.М. Жидкова, В.П. Максимова, Л.Р. Тилова	46
МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ ЭКЗОСОМ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ РАКЕ Е.А. Замбалова, А.А. Димча	49

ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ В ПРОГРЕССИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов, И.В. Дерюшева	52
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ U251 Н.А. Перекуча, М.В. Гридина, О.П. Иккерт	55
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У РАБОТНИКОВ СИБИРСКОГО ХИМИЧЕСКОГО КОМБИНАТА, ПОДВЕРГАВШИХСЯ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ (СРАВНЕНИЕ ДАННЫХ 2014 И 2019 ГОДОВ) Д.С. Исубакова, М.В. Халюзова, Е.В. Брониюковская	58
НАРУШЕНИЕ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА В МОДЕЛЬНЫХ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГАХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЦИСПЛАТИНА Е.О. Казакова, И.В. Ларионова, М.А. Ракина	61
РОЛЬ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЦИТОКИНА IL-10 ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ХЛОРИДОМ ТРИМЕТИЛОЛОВА Э.Р. Камалтдинова, Е.В. Першина	64
ИНФИЛЬТРАЦИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА M1- И M2- МАКРОФАГАМИ У ПАЦИЕНТОВ С ИНФАРКТОМ МИОКАРДА Б.Е. Ким, М.С. Ребенкова, А.Э. Гомбожапова	67
УЧАСТИЕ M-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ И АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЦА Б.К. Курбатов, Е.С. Прокудина	70
ЗАМКНУТЫЙ МИР РАСТЕНИЙ Д.С. Лазорин	73
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В КОМБИНАЦИИ С ИНГИБИТОРАМИ REDD1 НА МОДЕЛИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМЫ <i>IN VITRO</i> Е.С. Лылова, Е.А. Лесовая	77
ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ НАНОКРЕМНИЕМ НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К БОЛЕЗНЯМ И КАЧЕСТВО ЗЕРНА Б.И. Макаров	80
СОСТОЯНИЕ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ ПОЛУЧАЮЩИХ АНТИПСИХОТИЧЕСКУЮ ТЕРАПИЮ И.А. Меднова, А.С. Бойко, В.В. Дубровская	83
НАСЛЕДСТВЕННЫЙ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, АССОЦИИРОВАННЫЙ С МУТАЦИЕЙ ГЕНА <i>MUTYH</i> У ПАЦИЕНТКИ БУРЯТСКОЙ НАЦИОНАЛЬНОСТИ А.Ю. Молоков, П.А. Гервас, Е.В. Денисов	86
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRE/LOXP ДЛЯ ИНДУКЦИИ МНОЖЕСТВЕННЫХ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ГЕНОМЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА Р.В. Мунгалов	89
МУТАЦИОННЫЙ ЛАНДШАФТ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С РАЗНЫМИ ВАРИАНТАМИ ИНВАЗИВНОГО РОСТА Н.М. Новиков, С.Ю. Золотарёва, А.М. Киселёв	92
ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ЭЛЕМЕНТОВ В ВОЛОСАХ У ДЕТЕЙ БОЛЬНЫХ АУТИЗМОМ А.В. Обухова	95
ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ В.С. Овечкина	98
ВЛИЯНИЕ РЕДОКС ПОТЕНЦИАЛА ПЕЧЕНИ НА ПРОЦЕСС ФОРМИРОВАНИЯ ИНВАЗИИ <i>ORISTHORSCHIS FELINEUS</i> Е.А. Перина	101
РОЛЬ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА БЕТА 1 В МЕХАНИЗМАХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ТРИМЕТИЛОЛОМ Е.В. Першина, Э.Р. Камалтдинова	104

НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИИ ФУНКЦИИ КОГНИТИВНОГО КОНТРОЛЯ У ПАЦИЕНТОВ С АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТЬЮ А.Г. Пешковская, С.А. Галкин	107
ВЛИЯНИЕ ЛЕТАЛЬНОЙ МУТАЦИИ <i>YELLOW</i> В ГЕНЕ <i>AGOUTI</i> НА МОЗГ И ПОВЕДЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ С МУТАЦИЕЙ <i>A53T</i> В ГЕНЕ <i>SNCA</i> ЧЕЛОВЕКА А.В. Плюснина, Н.В. Хоцкин	110
ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ДИТЕРПЕНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ <i>ACONITUM BARBATUM</i> PATR. EX PERS А.А. Романов, М.В. Филонова, П.В. Кульпин	113
ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ВВЕДЕНИЕ НОВОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО АГЕНТА КАМФЕЦИНА О.П. Сальникова	116
ПОИСК МАРКЕРОВ АГРЕССИВНОСТИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ РАЗНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ Е.И. Семина, Т.С. Калинина	119
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ ГИДРОКСИАПАТИТОВ <i>IN VITRO</i> Д.А. Федоришин, А.А. Шнайдемиллер, Н.М. Коротченко	122
ВЛИЯНИЕ РАКА ЛЕГКОГО НА М1/М2 ПОЛЯРИЗАЦИЮ МАКРОФАГОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ А.А. Федоров, В.А. Попова	125
СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ И ТОКСИЧНОСТИ РИАМИЛОВИРА НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ <i>IN SILICO</i> И <i>IN VITRO/IN VIVO</i> К.Д. Федулова	128
ЗАКОНОМЕРНОСТИ ТЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСТРОФИИ РОГОВИЦЫ Е.О. Филиппова	131
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКУ ПИОЦИАНИНУ Е.А. Хан	134
ВЛИЯНИЕ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИ(L-ЛАКТИД-СО-ГЛИКОЛИД)А И ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ НА ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ Е. Шаповалова, В.В. Ботвин, А.С. Гигилев	137
ВЫХОД НА «SINGLE CELL»: ПОЛУЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК ИЗ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК С ЦЕЛЬЮ ИХ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ Д.В. Шарыш, А.В. Марков, Е.С. Григорьева	140
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ОПУХОЛЕВАЯ ПРОГРЕССИЯ КАРЦИНОМЫ ЛЬЮИСА НА ФОНЕ ВИРОТЕРАПИИ ВИРУСОМ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА <i>IN VIVO</i> Е.В. Шекунов, К.С. Юрченко	143
ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С ФОРМИРОВАНИЕМ МИЕЛИНОВОЙ ОБОЛОЧКИ НЕЙРОНОВ, В ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ 15-ДНЕВНЫХ САМЦОВ МЫШЕЙ А.С. Шулюпова, А.А. Лепешко, В.В. Решетников	146

АДСОРБЕНТЫ – ИХ РОЛЬ В ЭКОЛОГИИ И КАТАЛИЗЕ

С.И.Решетников

Институт катализа им. Г.К. Борескова,

Россия, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 5, 630090

E-mail: reshet@catalysis.ru**ADSORBENTS – THEIR ROLE IN THE ENVIRONMENT AND CATALYSIS**

S.I. Reshetnikov

Boreskov Institute of Catalysis, Pr. Akademika, Russia, Novosibirsk, Lavrentieva 5, 630090

E-mail: reshet@catalysis.ru

***Abstract.** Intensive development of the chemical industry is accompanied by environmental degradation associated with an increase in emissions of toxic substances into the atmosphere. The lecture will address issues related to the use of adsorption both in catalysis and in solving environmental problems.*

Явление адсорбции играет основополагающую роль, как в катализе, так и в решении экологических проблем. Интенсивное развитие химической промышленности неизбежно сопровождается ухудшением экологической обстановки связанной с увеличением выбросов токсичных веществ в атмосферу. Одним из широко используемых методов, обеспечивающих практически полное разделение и очистку газовых смесей от примесей, содержащихся в малых концентрациях, является адсорбционный метод, который основан на процессе поглощения газов поверхностным слоем твердого тела - адсорбента. В лекции рассмотрены наиболее широко применяемые типы адсорбентов: цеолиты, силикагели и др.. Основное внимание уделено процессу адсорбционной осушке сжатого воздуха от паров воды, который, получил широкое распространение практически во всех отраслях современной промышленности и производственных процессах. Представлен обзор результатов исследований, проводимых в ТГУ совместно с Институтом катализа СО РАН по разработке высокоэффективных алюмооксидных адсорбентов.

Адсорбция реагентов на поверхность катализатора является одной из основных промежуточных стадий катализа. В лекции рассмотрены основные механизмы протекания гетерогенных реакций (Лэнгмюра, Эли-Ридила, окислительно-восстановительный и др.). Особое внимание уделено определению условий проведения кинетического эксперимента (скорость подачи газовой смеси, размер зерна катализатора) при которых протекание реакции не осложнено процессами внешней и внутренней диффузии. Рассмотрены критерии, позволяющие определить кинетическую область протекания реакции.

Благодарность.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Минобрнауки Российской Федерации. Соглашение № 14.575.21.0139, идентификатор RFMEFI57517X0139.

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ КОРРОЗИЯ ПЛАТИНОВЫХ МЕТАЛЛОВ, ИНИЦИИРОВАННАЯ РЕАКЦИЯМИ ОКИСЛЕНИЯ СО И NH₃ КИСЛОРОДОМ

А.Н. Саланов

Институт катализа им. Г.К. Борескова, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 5, Россия

E-mail: salanov@catalysis.ru

Приведены результаты исследования каталитической коррозии платиновых металлов, инициированной реакциями окисления NH₃ и СО кислородом, которые применяются для промышленного производства HNO₃ и для защиты окружающей среды от опасных выбросов двигателей автотранспорта. Методами растровой электронной микроскопии (РЭМ) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) исследованы микроструктура, морфология и химический состав поверхности и приповерхностных слоев поликристаллической проволоки промышленных платиноидных сеток, содержащих Pt (81 мас. %), Pd (15 мас. %), Rh (3.5 мас. %) и Ru (0.5 мас. %) после окисления NH₃ (10 об. % NH₃) воздухом при 1133 К в течение 50 ч. После каталитического окисления NH₃ на тыльной стороне сетки (по ходу газа) наблюдалась структурная перестройка поверхностного слоя проволоки (каталитическая коррозия), в которой удалось выделить области с различной степенью коррозии. Анализ этих областей показал, что каталитическая коррозия платиноидной проволоки инициируется процессами травления поверхностного слоя в области межзеренных границ и дислокаций в ходе высоко экзотермической каталитической реакции окисления NH₃ кислородом, внедренным в области дефектов. Области с минимальной коррозией содержат гладкие зерна с кристаллическими террасами высотой 50 нм и ямками травления размером ~72 нм в концентрации $4.2 \times 10^8 \text{ см}^{-2}$. Области со средней коррозией включают шероховатые зерна с ямками травления размером ~85 нм в концентрации $2.5 \times 10^8 \text{ см}^{-2}$. Области с максимальной коррозией состоят из рекристаллизованных зерен с крупными порами размером 350–400 нм в концентрации $8.9 \times 10^6 \text{ см}^{-2}$. Эти зерна разделены пустотами шириной 1–5 мкм и глубиной до 10 мкм, что увеличивает удельную поверхность в приповерхностном слое проволоки. Рост удельной поверхности платиноидной проволоки сопровождается увеличением объемной скорости окисления NH₃ и, как следствие, локальными перегревами за счет высокой экзотермичности реакции. Рост температуры увеличивает скорость диффузии атомов металла, что, в свою очередь, ускоряет коррозию на этом участке. Эти процессы приводят к распространению коррозионной области по проволоке, что указывает на автокаталитический режим коррозии платиноидных сеток при окислении NH₃ кислородом. Результаты исследования коррозии платиновых металлов, инициированной каталитическими реакциями окисления СО и NH₃ позволят существенно продвинуться в понимании механизма каталитической коррозии платиноидных сеток, применяемых в практически важном промышленном процессе окисления аммиака воздухом.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственного задания ИК СО РАН (проект АААА-А17-117041710079-8)

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ НА ПРОРАСТАНИЕ ЗЕРЕН ПШЕНИЦЫК.Т.Муханбетжанова

Научный руководитель: доцент, к.т.н. А.Ю. Годымчук

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

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

E-mail: karlam1994@mail.ru**INFLUENCE OF METAL NANOPARTICLES ON THE GROWTH OF WHEAT GRAINS**K.T.Mukhanbetzhanova

Scientific Supervisor: Ph.D. A.Yu. Godymchuk

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

E-mail: karlam1994@mail.ru

***Abstract.** The growth in the production and consumption of metal nanoparticles and their increased reactivity are prerequisites for emerging study of nanoparticles' biological properties. The work shows the effect of nickel, zinc and copper (Zn, Cu, Ni) nanoparticles on the biometric properties of Iren wheat seedlings. It has been established that the length of the wheat root decreases in the series Zn ... Ni ... Cu by 7 ... 21 ... 40 %, respectively, compared to the control. Nevertheless, the chosen metal nanoparticles promote the stimulation of the aerial part growth: the air-dried mass of the wheat aerial part is higher by 83 ... 44 ... 28 %, respectively, when Cu ... Zn ... Ni nanoparticles are added.*

Введение. Развитие и внедрение нанотехнологий привело к необходимости изучения влияния техногенных наночастиц на жизнедеятельность живых организмов, в том числе растений [1, 2]. Растительные объекты преимущественно используются в опытах по биотестированию наночастиц [3, 4], поскольку они чрезвычайно восприимчивы к внешним слабоинтенсивным факторам, а их чувствительность на порядок превышает чувствительность объектов животного происхождения. Известно, что благодаря постепенному окислению в почве наночастицы металлов способны могут создавать неблагоприятные условия для патогенных микроорганизмов и условия для выделения микроэлементов, поглощаемых растениями [5, 6].

Целью настоящей работы являлось определение влияния состава наночастиц на морфологические свойства пшеницы, пророщенной в лабораторных условиях.

Экспериментальная часть. В работе использовали три нанопорошка: никеля (Ni), меди (Cu) и цинка (Zn), полученных методом электрического взрыва проволоки в инертной среде (ООО «Передовые порошковые технологии», г. Томск). Согласно данным электронной микрокопии средний размер исследуемых нанопорошков составлял 90 нм.

В эксперименте все суспензии готовили на основе питательного раствора Хьюитта, солевой состав которого содержит необходимые микроэлементы (N – 168 мг/л, P – 41 мг/л, Ca – 160 мг/л, K – 56 мг/л, S – 48 мг/л и Mg – 36 мг/л) для прорастания семян. В эксперименте 25 семян пшеницы сорта Ирень (урожая 2017 года), равномерно распределенных на фильтровальной бумаге в чашке Петри, смачивали 7 мл суспензии (концентрация наночастиц 100 мг/л), обработанной в ультразвуковой ванне в течение часа

(мощность 50 Вт). После 48-часовой выдержки закрытых чашек при 25 °С (рис.1а) измеряли длину проростка пшеницы путем обработки фотографий в CorelDRAW X7(64-Bit).

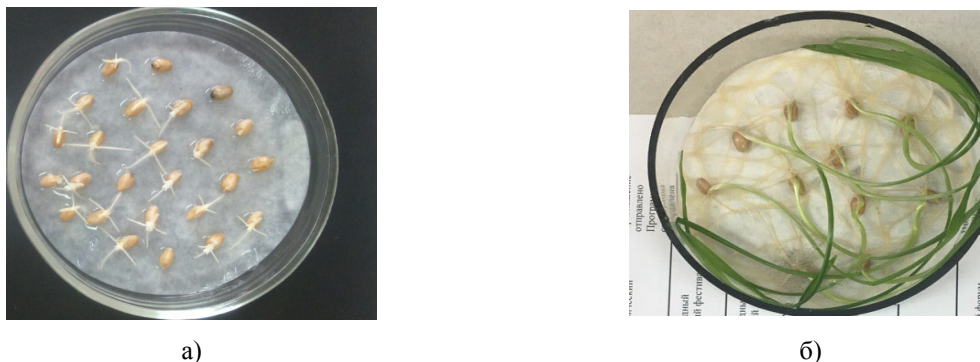


Рис.1. Фотографии семян пшеницы с проросшими зернами (а) и с проросшей наземной частью (б)

Для определения фотосинтезирующей биомассы корни возвращали в чашки, и пшеницу выращивали под климатической лампой в течение 5 дней (рис.1б). Воздушно-сухая масса надземной части пшеницы рассчитывалась как разница между живым весом проросшей зелени за вычетом воды, испарившейся из нее после высушивания растения в атмосфере воздуха при 40 °С в течение 24 ч.

Результаты. Согласно полученным экспериментальным данным состав наночастиц оказывает разное влияние на морфологические параметры проросшей пшеницы.

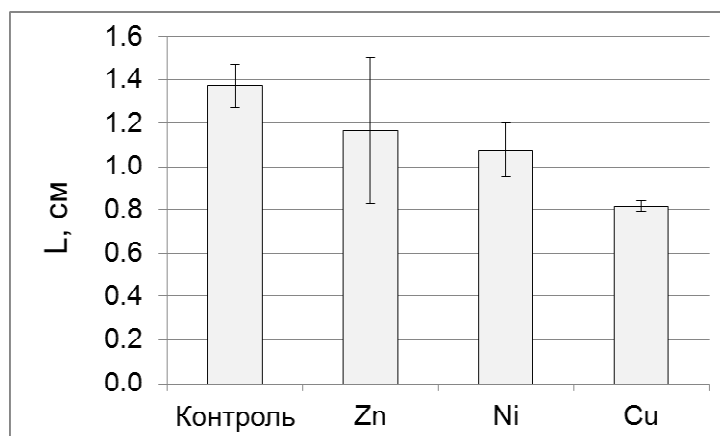


Рис.2. Длина проростка пшеницы, L (однократный эксперимент, 25 зерен)

Установлено, что длина проросшего корня пшеницы уменьшается в ряду «контроль...Zn...Ni...Cu». При этом уменьшение длины корня по сравнению с контролем (1,37 см) после добавления наночастиц на 7...21...40 %, соответственно для суспензий Zn...Ni...Cu (рис.2).

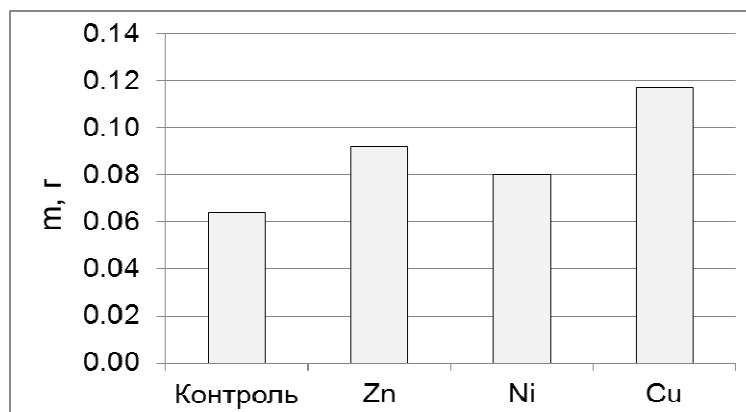


Рис. 3. Воздушно-сухая масса надземной части, *m* (однократный эксперимент, 25 зерен) пшеницы

Далее показано, что независимо от состава нанопорошков, воздушно-сухая масса надземной части пшеницы выше при добавлении наночастиц по сравнению с контролем. Так, в суспензиях наночастиц Cu...Zn...Ni биомасса надземной пшеницы больше на 83...44...28 %, соответственно (рис.3).

Заключение. В работе получены предварительные результаты по влиянию наночастиц на биометрические параметры проросшей пшеницы. Экспериментальные данные позволили установить, что при добавлении наночастиц металлов Cu, Zn и Ni наночастиц в концентрации 100 мг/л приводит к подавлению роста корня (в среднем на 20%), но при этом стимулировать образование фотосинтезирующей биомассы пшеницы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ling Y., Yatts D. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles // Journal of Toxicology Letters. – 2005. – P.122–132.
2. Zhu H., Han J., Xiao J.Q., Jin Y. Uptake, translocation and accumulation of manufactured ironoxide nanoparticles by pumpkin plants // Journal of Environment Monitoring. – 2008. – V.10. – P. 713–717.
3. Yatts D., Ling Y. Nanoparticles could have a negative effect on plant growth // Journal of Nanotechnologies News. – 2007. – V.3. – P.86–92.
4. Моргалёв Ю.Н., Хоч Н.С., Моргалёва Т.Г., Гулик Е.С., Борило Г.А., Булатова У.А., Моргалёв С.Ю., Понявина Е.В. Биотестирование наноматериалов: о возможности транслокации наночастиц в пищевые сети // Российские нанотехнологии. – 2010. – Т.5, №11. – С. 131–135.
5. Глущенко Н.Н., Богословская О.А., Ольховская И.П. Сравнительная токсичность солей и наночастиц металлов и особенность их биологического действия // Нанотехнологии и информационные технологии – технологии XXI века. – Материалы Международной научно-практической конференции. Москва, 2006. – С. 93–95.
6. Володина Л.А., Жигач А.Н., Лейпунский И.О., Зотова Е.С., Глущенко Н.Н. Влияние физико-химических характеристик модифицированных поверхностей наноразмерных частиц меди на ингибирование роста культуры клеток и электростатические свойства поверхности бактерий // Биофизика. – 2013. – Т. 58, №3. – С. 507–515.

**АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ У СИРИЙСКОГО ХОМЯЧКА
(MESOCRICETUS AURATUS): ВЛИЯНИЕ СВЕТОВОГО РЕЖИМА СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИИ И
ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА**

П.А. Астафьева¹, А.В. Морозов², Е.П. Антонова²

Научный руководитель: профессор, д.б.н. А.В. Коросов¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Петрозаводский государственный университет», Россия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, 185000

²Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской
академии наук», Россия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д.11, 185910

E-mail: poly.astafiewa2011@yandex.ru

**ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES IN SYRIAN HAMSTER (MESOCRICETUS AURATUS):
EFFECTS OF THE RUSSIAN NORTH-WEST LIGHT CONDITIONS AND EXOGENOUS
MELATONIN**

P.A. Astafieva, A.V. Morozov, E.P. Antonova

Scientific Supervisor: Prof., Dr. A.V. Korosov

¹Petrozavodsk State University, Russia, Petrozavodsk, Lenin Street, 33, 185910

²Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russia,
Petrozavodsk, Pushkinskaya Street, 11, 185910

E-mail: poly.astafiewa2011@yandex.ru

Abstract. We studied the effects of the light conditions of North-West of Russia (NL) and exogenous melatonin (100 µg / day / animal) in digestive enzymes activity in the pancreas and small intestine mucosa in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). Female hamsters were exposed to a 12:12 light/dark cycle (LD) or NL for 3 months. In each light conditions hamsters were divided into two groups: LD-control, NL-control (received placebo); LD-mel, NL-mel (received melatonin). Animals kept in the NL conditions had the decreased activities of pancreatic α-amylase and γ-amylase in the small intestine and the increased serum α-amylase and total proteolytic activities in the studied organs. No significant effect of light conditions on lipolytic activities in the pancreas and small intestine was found. In pancreas melatonin treatment caused the increase in α-amylase activity and the decrease in lipase activity in LD + mel and NL + mel hamsters, and in the small intestine it led to the increase in γ-amylase (NL + mel) and in lipase (LD + mel and NL + mel) activities. Obtained results contribute to the expansion of scientific knowledge about the adaptations' strategies to the northern photoperiodic conditions, as well as understanding the mechanisms to prevent their pathological consequences.

Введение. Север – особая климатогеографическая зона, где организм испытывает неблагоприятное воздействие совокупности факторов. Животные северных регионов подвергаются смене длительных периодов постоянного света в летний сезон и постоянной темноты зимой, тогда как LD цикл освещения (12 ч свет:12 ч темнота) наблюдается только в течение нескольких недель во время весеннего и осеннего равноденствия. Реакция организма на изменение световых условий окружающей среды обусловлена функцией нейроэндокринного органа – пинеальной железы (ПЖ), которая

осуществляет многочисленные модулирующие влияния на физиологические системы организма в основном посредством своих гормонов, одним из которых является мелатонин. Так как свет угнетает продукцию мелатонина, его максимальный уровень в ПЖ и крови млекопитающих наблюдается в ночные часы, а минимальный – в утреннее и дневное время. В организме млекопитающих присутствует и экстрапинеальный мелатонин, т. е. выработанный вне ПЖ. В желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) вырабатывается в 400 раз больше мелатонина, чем в ПЖ, однако его вклад в объем циркулирующего в крови мелатонина невелик, так как около 90 % гормона, поступающего из тканей ЖКТ в портальную вену, метаболизируется уже на первом пассаже через печень [1]. Независимо от места синтеза, влияние мелатонина на пищеварительную функцию связано с угнетением перистальтических движений кишечника [2,3], а также с регуляцией активности пищеварительных ферментов [4]. На данный момент существуют лишь фрагментарные сведения о механизмах адаптаций пищеварительной системы млекопитающих к условиям, учитывающим особенности годовой фотопериодичности районов Севера, что создаёт предпосылки для комплексного исследования в данной области.

В связи с этим, целью настоящего исследования было изучение влияния фотопериодических условий Северо-Запада России в сочетании с экзогенным мелатонином на некоторые физиолого-биохимические показатели крови (активность амилазы, содержание глюкозы и холестерина) и активность пищеварительных ферментов у самок сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*).

Экспериментальная часть. Животные были рандомизированно разделены на 2 группы: контроль (LD) и опыт (смоделированное освещение Республики Карелия (NL)). Каждая группа была разделена на 2 подгруппы: хомяки 1-й подгруппы получали 5 раз в неделю с питьевой водой в ночное время мелатонин (100 мкг на животное) (LD+mel, NL+mel), 2-й - питьевую воду без мелатонина. Исследование проводили с периода летнего солнцестояния 25 июня (NL: 19.36 свет /4.24 темнота) (максимальная продолжительность дня в Карелии) по 25 сентября (период осеннего равноденствия) (NL: 12/12). Через один (NL: 18/6) и три месяца (NL: 12/12) эксперимента животных декапитировали и отбирали образцы крови, тканей поджелудочной железы (ПЖЖ) и тонкого кишечника (ТК) для последующего анализа. Активность ферментов определяли спектрофотометрически: общую протеолитическую активность (ОПА) определяли по приросту тирозина при гидролизе гемоглобина, амилазы - по убыли крахмала, а липазы - по приросту глицерина при гидролизе трибутирина. Активность ферментов выражали в мкмоль продуктов гидролиза (для амилазы - в мг крахмала), образующихся за 1 мин в расчете на 1 г ткани, уровень глюкозы и холестерина - в ммоль/л. Полученные цифровые материалы обрабатывали общепринятыми методами статистики.

Результаты. В ходе выполнения проекта была проведена оценка активности пищеварительных ферментов в различных световых режимах (LD, NL) и при введении экзогенного мелатонина у самок сирийского хомячка. Содержание животных в NL режиме оказало значительное влияние на активность α -, γ -амилазы. Так, например, уже в первый месяц эксперимента было обнаружено достоверное увеличение активности α -амилазы в сыворотке крови у животных опытной группы NL ($4274,5 \pm 462,3$ Ед/л) по сравнению с контролем LD (3219 ± 60 Ед/л). Однако при исследовании активности данного фермента в органах наблюдалась противоположная картина – амилазная активность у особей из NL в ПЖЖ ($60,33 \pm 6,4$) и ТК ($15,80 \pm 0,76$) была достоверно ниже, чем у животных из LD ($95,81 \pm 3,29$ и $27,61 \pm 0,92$ соответственно). После трех месяцев применения препарата мелатонина в NL режиме

выявлено увеличение активности амилазы как в сыворотке крови ($4988,9 \pm 571,07$), так и в ПЖЖ ($85,39 \pm 3,09$) и ТК ($23,86 \pm 1,76$) по сравнению с NL ($4730,7 \pm 250,05$, $60,33 \pm 2,80$ и $15,80 \pm 0,76$). Также мелатонин вызывал достоверное увеличение уровня глюкозы в сыворотке крови в первый месяц эксперимента в NL+mel ($3,42 \pm 0,33$) и LD+mel ($2,98 \pm 0,08$) по сравнению с LD ($2,29 \pm 0,19$). Возможно, обнаруженные нами более высокие уровни активности α - и γ -амилазы в NL режиме и при введении мелатонина связаны с регуляторной функцией этого гормона в ЖКТ. Уменьшение продолжительности светового дня в изучаемый период в NL могло привести к увеличению продукции пинеального мелатонина, который играет существенную роль в регуляции работы ЖКТ. Ранее было показано, что применение мелатонина вызывало дозозависимое увеличение активности α -амилазы в сыворотке крови [4], а нарушение суточной цикличности синтеза мелатонина способно провоцировать развитие острого панкреатита [1].

В результате проведенного исследования не обнаружено достоверного влияния световых режимов на липолитическую активность изучаемых органов. Однако применение мелатонина в NL+mel уже в первый месяц эксперимента привело к снижению активности панкреатической липазы ($0,98 \pm 0,3$) и увеличению общего холестерина ($2,84 \pm 0,19$) и липазы в ТК ($2,27 \pm 0,03$) по сравнению с LD ($2,84 \pm 0,44$, $2,17 \pm 0,04$ и $1,87 \pm 0,09$ соответственно). Через три месяца эксперимента различий в активности липазы и содержании холестерина в сыворотке крови не было обнаружено. Влияние световых режимов на ОПА наблюдалось и в ПЖЖ, и в ТК сирийских хомячков: в первый месяц эксперимента у животных NL была выявлена более высокая ОПА по сравнению с LD, но после трех месяцев эксперимента различия в ТК нивелировались. Ведение мелатонина оказало влияние только на ОПА в ПЖЖ – в NL+mel наблюдалось ее снижение, в LD+mel – увеличение. Достоверного эффекта мелатонина на ОПА в ТК не обнаружено.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о чувствительности пищеварительных ферментов в тканях ПЖЖ и ТК к фотопериоду и экзогенному мелатонину у сирийских хомячков. По нашему мнению, выявленные различия между световыми режимами связаны прежде всего с изменением синтеза мелатонина ПЖ при смене световых условий. Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221-2017-0052), а также при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 18-34-00035 мол_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jaworek J., Nawrot-Porabka K., Leja-Szpak A. et al. Melatonin as modulator of pancreatic enzyme secretion and pancreatoprotector // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 58, № 6. – P. 65–80.
2. Chen C., Fichna J., Bashashati M. et al. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut // *World J. Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 17, № 34. – P. 3888–3898.
3. Thor P.J., Krolczyk G., Gil K. et al. Melatonin and serotonin effects on gastrointestinal motility // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 58, № 6. – P. 97–103.
4. Leja-Szpak A., Jaworek J., Nawrot-Porabka K. et al. Modulation of pancreatic enzyme secretion by melatonin and its precursor; L-tryptophan. Role of CCK and afferent nerves // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 55. – P. 33-46.

**ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ МОЗГОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА
И АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ**А.С. Бойко

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

НИИ психического здоровья Томского научного исследовательского медицинского центра РАН,

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

E-mail: anastasya-iv@yandex.ru**GENE POLYMORPHISMS OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR AND ANTIOXIDANT
ENZYMES IN SCHIZOPHRENIA**A.S. Boiko

Scientific Supervisor: Prof., Dr. Ivanova S.A.

Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of

Sciences, Russia, Tomsk, Aleutskaya str., 4, 634014

E-mail: anastasya-iv@yandex.ru

Abstract. *The contribution of genetic factors to the development of schizophrenia reaches 80%. The aim of the work is to study polymorphic variants of genes of antioxidant enzymes SOD2 (rs4880), GSTO1 (rs4925), NQO1 (rs1800566) and BDNF (rs6265, rs7124442, rs11030104) in schizophrenia depending on the prevailing negative and positive symptoms. A clinical and biological examination of 469 patients with schizophrenia and 127 healthy individuals was conducted. Significant differences in the distributions of genotypes of polymorphisms rs7124442 and rs11030104 of gene BDNF have been identified in groups of patients with schizophrenia and healthy individuals. Differences in the distribution of alleles of the polymorphism rs7124442 have been identified in groups of patients with the leading negative and positive symptoms. Changes in the frequency of genotypes and alleles of polymorphic variants of this gene demonstrate protective and predisposing effects on the risk of mental disorders and the impact on clinical polymorphism of schizophrenia.*

Введение. Первое место среди эндогенных психозов занимает шизофрения, которая представляет собой сложный и гетерогенный комплекс нарушений с полигенной архитектурой [1]. Вклад генетических факторов в развитие шизофрении достигает 80% [2]. Режим наследования является сложным, менделевским, и в большинстве случаев с участием совместного действия большого числа генов [3]. Основные особенности этого заболевания характеризуются тремя доменами симптомов (позитивные, негативные симптомы и когнитивный дефицит), взаимное перекрытие которых образует полиморфизм его клинических проявлений [4]. Нейротрофические факторы влияют на познание, модулируя нейропластичность и нейромедиаторные системы. Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) играет важную роль в дифференцировке клеток, выживании, долговременной потенциации, синаптической пластичности, обучении и памяти [5, 6]. Активация окислительного стресса и нарушение активности антиоксидантных ферментов рассматривается как неспецифический компонент патогенеза шизофрении, что предполагает наличие возможных ассоциаций генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, с развитием заболевания и когнитивного дефицита [7].

Целью работы является изучение полиморфных вариантов генов антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы *SOD2* (rs4880), глутатион-S-трансферазы омега 1 *GSTO1* (rs4925), NAD(P)H-дегидрогеназы [хинон] 1 *NQO1* (rs1800566) и мозгового нейротрофического фактора *BDNF* (rs6265, rs7124442, rs11030104) при шизофрении в зависимости от преобладающей негативной и позитивной симптоматики.

Материалы и методы. Исследование проводилось в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации, разработанными для экспериментов с участием человека. Было проведено комплексное клиничко-биологическое обследование 469 больных шизофренией, находящихся на лечении в психиатрическом стационаре. Критериями включения являются: верифицированный диагноз шизофрении по МКБ-10, возраст 18-60 лет, получение информированного согласия пациента, отсутствие органической, неврологической и тяжелой соматической патологии. Контрольную группу составили 127 практически здоровых лиц, соответствующих пациентам по полу и возрасту. В исследуемую выборку вошли представители русской национальности, проживающие в регионе Сибири. Диагностическая оценка и клиническая квалификация расстройств проводилась с применением клиничко-психопатологического, клиничко-динамического и психометрического методов врачами-психиатрами.

У обследованных лиц для биологических исследований брали кровь из локтевой вены с последующим выделением геномной ДНК стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфных вариантов генов проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на амплификаторах StepOnePlus™ Real-Time PCR System и Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием наборов TaqMan1 Validated SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, США).

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета SPSS 23.0 для Windows. Для проверки соответствия распределения частот генотипов исследуемых генов равновесному распределению Харди-Вайнберга использовался модифицированный критерий «хи-квадрат». Сравнение частот генотипов и аллелей двух анализируемых групп проводили с помощью критерия Фишера. Для оценки эффекта влияния генетического полиморфизма был рассчитан показатель «отношение шансов» (odds ratio, OR) и 95% доверительный интервал (confidence intervals, CIs). Критический уровень значимости составил 0,05.

Результаты. При анализе результатов генотипирования были выявлены значимые различия распределений генотипов двух полиморфизмов гена *BDNF* в группах больных шизофренией и здоровых лиц. У больных шизофренией наблюдается более частое носительство генотипа CC полиморфизма rs7124442 по сравнению со значениями здоровых лиц (10,5% и 1,6% соответственно), распределение генотипов CC:CT:TT у пациентов составило 10,5%:38,3%:51,2%, в группе здоровых лиц 1,6%:42,9%:55,6% ($\chi^2=9,973$, $p=0,007$). Частота встречаемости аллеля C в группе больных также выше, чем у здоровых лиц (29,6% и 23%, $\chi^2=4,27$, $p=0,04$), и характеризуются predisponирующим эффектом (OR=1,41, 95% CIs: 1,02-1,95). Распределение генотипов GG:GA:AA полиморфизма rs11030104 так же различается в сравниваемых группах: в группе больных шизофренией оно составило 8,6%:25,7%:65,8%, в контрольной группе – 4,9%:36,6%:58,5% ($\chi^2=6,61$, $p=0,037$).

В ходе клиничко-психопатологического обследования у больных шизофренией была определена ведущая симптоматика, и пациенты были разделены на группы: 235 пациентов с преобладанием

позитивной симптоматики, 193 пациента с негативной симптоматикой и у 41 пациента ведущая симптоматика была не определена. В группах пациентов с ведущей негативной и позитивной симптоматикой были выявлены различия в распределении аллелей полиморфизма rs7124442 гена *BDNF*. У больных шизофренией с позитивной симптоматикой частота встречаемости аллеля С выше, а аллеля Т ниже по сравнению с пациентами с ведущей негативной симптоматикой (33,2% и 26,7%, 66,8% и 73,3% соответственно; $\chi^2=4,11$, $p=0,04$). Аллель С обладает протективным эффектом, а аллель Т predisponирующим в отношении преобладания негативной симптоматики ($OR_1=0,73$, 95%CI: 0,54-2,99; $OR_2=1,36$, 95%CI: 7,01-1,84). Распределения генотипов полиморфизмов генов антиоксидантных ферментов в исследуемой выборке значимо не различались.

Выводы. В нашем исследовании была выявлена ассоциация между геном *BDNF* и шизофренией. Изменение частот встречаемости генотипов и аллелей полиморфных вариантов этого гена демонстрирует протективный/предиспонирующий эффекты относительно риска развития самого психического заболевания, так и влияние на клинический полиморфизм шизофрении. Однако точная роль этих генов требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-315-20019 «Новые подходы к генетике клинического полиморфизма и нейрокогнитивного дефицита при шизофрении».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sullivan P.F., Daly M.J., O'Donovan M. (2012) Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications. *Nat Rev Genet*, no 13(8), pp. 537-51.
2. Sabb F.W., Bearden C.E., Glahn D.C., Parker D.S., Freimer N., Bilder R.M. (2008) A collaborative knowledge base for cognitive phenomics. *Mol Psychiatry*, no 13(4), pp. 350-60.
3. Giegling I., Hosak L., Mössner R., Serretti A., Bellivier F., Claes S., Collier D.A., Corrales A., DeLisi L.E., Gallo C., Gill M., Kennedy J.L., Leboyer M., Maier W., Marquez M., Massat I., Mors O., Muglia P., Nöthen M.M., Ospina-Duque J., Owen M.J., Propping P., Shi Y., St Clair D., Thibaut F., Cichon S., Mendlewicz J., O'Donovan M.C., Rujescu D. (2017) Genetics of schizophrenia: A consensus paper of the WFSBP Task Force on Genetics. *World J Biol Psychiatry*, no 18(7), pp. 492-505
4. Шизофрения: биопсихосоциальная модель и конституционально-биологический подход // Корнетова Е.Г., Семке А.В., Корнетов А.Н., Иванова С.А., Лобачева О.А., Семенюк К.А., Бойко А.С., Бохан Н.А. – Томск: ООО "Интегральный Переплет", 2018. – 174 с.
5. Левчук Л.А., Вялова Н.М., Михалицкая Е.В., Семкина А.А., Иванова С.А. Роль *BDNF* в патогенезе неврологических и психических расстройств // Современные проблемы науки и образования. – 2018. - № 6. – С. 58.
6. Cowansage K.K., LeDoux J.E., Monfils M.H. (2010) Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol*, no 3(1), pp. 12-29.
7. Иванова С.А., Смирнова Л.П., Щигорева Ю.Г., Бойко А.С., Семке А.В., Узбеков М.Г., Бохан Н.А. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и каталазы в эритроцитах больных шизофренией в динамике фармакотерапии традиционными антипсихотическими препаратами // Нейрохимия. – 2014. – Т. 31. № 1. – С. 79.

**СВЯЗЬ УРОВНЯ КОРТИКОСТЕРОНА И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА
ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МИКРОВОЛНОВЫХ ИМПУЛЬСОВ**

А.В. Васильев, А.А. Гороховский

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

Сибирский государственный медицинский университет,

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

E-mail: culackova.dunk@yandex.ru

**CORRELATION BETWEEN CORTICOSTERONE LEVEL AND OXIDATED STRESS AFTER
EFFECT OF MICROWAVE PULSES**

A.V. Vasilev, A.A. Gorokhovsky

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

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

E-mail: culackova.dunk@yandex.ru

***Abstract.** This research presents the results of pulsed microwave radiation impact on corticosterone levels with an assessment of the possibility of developing a stress reaction in response to oxidative stress caused by the radiation effect on the mice's organism. The radiation source was a pulse generator based on a MI-505 magnetron. Mice were irradiated with repetition rates of 8, 13, 16 and 22 Hz.*

Введение. За последние десятилетия исследования, направленные на изучение воздействия импульсных микроволновых излучений, продолжают формировать представление о возможности их влияния на различные биологические системы, в том числе на организм человека. В эпоху информационного бума необходимо более полное понимание физиологических и патофизиологических процессов, происходящих под влиянием электромагнитных излучений на объекты разных уровней организации живой природы. Знания этиологии, патогенеза и внутрисистемных взаимосвязей способны пролить свет на мультифакториальную основу стресс-ассоциированных заболеваний, которые также могут быть обусловлены воздействием импульсного электромагнитного излучения [1]. Уровень кортикостерона, показатели электрической проводимости тканей, степень модифицированности биомолекул, а также уровень активных форм кислорода у лабораторных мышей – модели, частично способные раскрыть сложные механизмы, вызванные нетепловым микроволновым излучением.

Цель работы. Сравнительный анализ изменения содержания кортикостерона и показателей оксидативного стресса в сыворотке крови после облучения мышей микроволновыми импульсами.

Материал и методы. Исследование выполнено на 30 белых мышах-самцах, разделенных случайным образом на пять групп. Контролем выступали ложнооблученные животные. Мыши подвергались воздействию излучения в течение пяти суток один раз в сутки (4000 импульсов за сеанс) с частотами повторения микроволновых импульсов 8, 13, 16 и 22 Гц. Источником излучения являлся магнетрон МИ-505 (Россия, Институт сильноточной электроники СО РАН, несущая частота 10 ГГц, выходная пиковая мощность 180 кВт, длительность импульсов 100 нс, средняя плотность потока мощности 1,5 мВт/см²). Уровень кортикостерона определялся в твердофазной среде путем

иммуноферментного анализа. Полученные данные сравнивались с результатами ранее проведенных исследований по оценке интенсивности окислительных процессов в тканях мышей после воздействия импульсного микроволнового излучения [2] с использованием той же облучающей установки биологической группой Отдела физической электроники Института сильноточной электроники СО РАН. В качестве маркеров оксидативного стресса использовались показатели окислительной модификации биополимеров, в частности уровень малонового диальдегида (МДА) как показатель окислительной модификации липидов и уровень карбонилированного белка (КБ) как показатель окислительной модификации белков.

Результаты. После проведения корреляционного анализа с учетом ложнооблученных животных между уровнем кортикостерона в сыворотке лабораторных животных и уровнями малондиальдегида, карбонилированного белка при частотах 8, 13, 16 и 22 Гц – для кортикостерона и 10, 13, 16, 25 Гц – для оксидативных показателей, а также между уровнями МДА и КБ (через 24 и 72 часа после облучения); коэффициент корреляции составил менее модульного значения (0,600), что свидетельствует о слабой коррелятивной связи. Однако математический анализ показал, что между уровнем МДА спустя 72 часа после воздействия и уровнем кортикостерона наблюдается положительная коррелятивная связь (коэффициент корреляции 0,744). Между уровнем МДА через 24 часа и КБ через 72 часа после облучения зафиксирована отрицательная коррелятивная связь (коэффициент корреляции -0,896). Корреляция продемонстрирована в таблице (Таблица 1).

Таблица 1

Корреляционные показатели

	МДА 24 часа	МДА 72 часа	КБ 24 часа	КБ 72 часа	Кортикостерон
МДА 24 часа	+1	-0,02	-0,558	-0,896	+0,102
МДА 72 часа	-0,02	+1	-0,509	+0,379	+0,744
КБ 24 часа	-0,558	-0,509	+1	+0,471	-0,504
КБ 72 часа	-0,896	+0,379	+0,471	+1	+0,112
Кортикостерон	+0,102	+0,744	-0,504	+0,112	+1

Показатели, предоставленные в исследованиях, проиллюстрировали наличие оксидативного и системного стресса в лабораторной модели исследования влияния микроволновых импульсов на организм. Показатели оксидативного и системного стресса в большей степени независимы друг от друга. Однако коррелятивная связь между МДА и уровнем кортикостерона показывает, что данные показатели частично зависимы друг от друга. Данное соотношение может говорить о том, что системного стресс может индуцироваться в ответ на стимуляцию перекисного окисления липидов. На это также указывает сохранение высокого значения МДА через 72 часа после воздействия излучения и объясняется тем, что регуляция посредством гипоталамо-гипофизарной системы подключается после длительного стрессорного воздействия. Следует отметить, что наибольшие значения показателей кортикостерона и МДА фиксируется при частоте повторения микроволновых импульсов 13 Гц, что указывает на высокую чувствительность организма к этой частоте.

Выраженная обратно пропорциональная связь между уровнем МДА через 24 часа и КБ через 72 часа после облучения, а так же изменения между другими кривыми может быть объяснено тем, что при частоте 10 Гц через 24 часа после воздействия излучения антиоксидантная система (АОС) реализует свой потенциал при связи с белковыми молекулами, но при повышении частотного воздействия АОС смещает фокус на инактивацию МДА, однако, при этом растет уровень КБ через 24 и 72 часа после облучения, что может свидетельствовать о включении белкового буфера для предотвращения неконтролируемого сигналинга, так как МДА в свою очередь является метаболитом, ассоциированным с липидными биомолекулами в том числе арахидоновой кислотой [3]. Уменьшение КБ через 24 часа после облучения при частоте 10 Гц также может быть связано с антиоксидативной функцией импульсного излучения, уменьшающую базальную активность окислительных процессов [4] или, возможно, непосредственно с протеолизом карбонилированного белка. Однако, не все процессы удается зафиксировать в лабораторных данных, иногда изменения в активности оксидативных и гормональных механизмов связано с образованием других, но связанных между собой продуктов.

Длительный оксидативный стресс приводит к первоначальному истощению пула АОС с дальнейшей активацией стресс-гормонов (кортикостерона, кортизола) путем прямого воздействия на кору надпочечников или же опосредованно через гипоталамо-гипофизарный тракт. В свою очередь пик гормональной активности способен предотвратить неконтролируемый сигналинг внутри клеток и стабилизировать мембраны. Часть окисленных продуктов может подвергаться метаболизму в печеночной ткани и снижать действие системного и окислительного стресса.

Заключение. Системный и оксидативный стресс являются важными составляющими при действии микроволнового излучения. Данные процессы отражают сложные системные метаболические взаимодействия. Некоторые процессы протекают в разные периоды стрессорного состояния, а некоторые наоборот протекают параллельно. Понимание этиологии, импульсного излучения, является важнейшей задачей для интеграции новых технологий и защиты от их возможного пагубного воздействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knyazeva, I., Medvedev, M., Kutenkov, O., Vasilev, A., Gorokhovskiy, A., & Rostov, V. (2018) The Features of the Stress-Reaction to Repetitive Nanosecond Microwave Pulses [Electronic version] *20th International Symposium on High-Current Electronics (ISHCE)*, pp. 94–97.
2. Bol'shakov, M., Knyazeva, I., Rostov, V., Korovin, M., Neverova, L., Afanas'ev, K., & Klimov, A. (2005). Initiation of Free-Radical Oxidation in Albino Mice by Exposure to Pulse Periodic Microwaves and X-Rays [Electronic version]. *Biophysics*, no. 50, pp. 104–109.
3. Cotgreave, I. (2005) Biological stress responses to radio frequency electromagnetic radiation: are mobile phones really so (heat) shocking? [Electronic version]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, no. 435, pp. 227–240.
4. Егизарян Р. Л. Влияние электромагнитного излучения с частотой 900 МГц на некоторые показатели крови // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2013. – Т. 53, № 1. – С. 63–70.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТЕОГЕННОЙ ИНДУКЦИИ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОБРАБОТКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СУСПЕНЗИЕЙ,
СОДЕРЖАЩЕЙ ФАКТОРЫ РОСТА КЛЕТОЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

С.А. Васильев¹, Р.Р. Савченко¹, Е.Г. Шаповалова²

Научный руководитель: к.м.н. Н.А. Скрябин¹, руководитель фармпроектов ИХТЦ Л.А. Покровская

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального
исследовательского медицинского центра,
Россия, г. Томск, ул. Наб. р. Ушайки, 10, 634050

² Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050
E-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

**STUDY OF OSTEOGENIC INDUCTION IN HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AFTER
EXPOSURE TO AN EXPERIMENTAL SUSPENSION CONTAINING GROWTH FACTORS OF
CELLULAR ORIGIN**

S.A. Vasilyev¹, R.R. Savchenko¹, E.G. Shapovalova²

Scientific Supervisor: N.A. Skryabin¹, PhD; Head of Pharmaceutical Projects ECTC L.A. Pokrovskaya

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Medical Research Center,
Russia, Tomsk, Nab r. Ushayki, 10, 634050

² Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050
E-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

***Abstract.** In this work, we evaluated the osteoinductiveness of an experimental suspension using the immunofluorescence method and the analysis of gene expression using real-time PCR. The results of the study indicate the high osteoinductive properties of the developed experimental suspension containing growth factors of cellular origin. Treatment of mesenchymal stem cells with an experimental suspension leads to the efficient expression of mRNA of the osteogenic induction marker genes RUNX2 and YAP1, while at 3 and 7 days the values exceed those for standard osteogenic inducers.*

Введение. В настоящей работе проведена оценка остеоиндуктивности экспериментальной суспензии с использованием иммунофлуоресцентного метода и анализа экспрессии генов с помощью ПЦР в режиме реального времени. В качестве маркеров остеогенной индукции выбраны факторы транскрипции Osterix, Runx2 и YAP1. На ранних этапах остеогенной индукции в стволовых клетках стимулируется экспрессия ряда генов-факторов транскрипции [1, 2, 3]. На молекулярно-генетическом уровне ключевыми регуляторами остеогенеза являются факторы транскрипции Runx2 (cbfa-1), YAP1 и Osterix.

Runx2 принадлежит к семейству Runx, которое состоит из Runx1, Runx2 и Runx3. Runx2 считается основным фактором транскрипции остеобластов. Он был идентифицирован как фактор, связывающийся со специфическим цис-действующим элементом остеобластов в промоторе генов, кодирующих остеокальцин [3]. Osterix (Osx, также известный как Sp7) является вторым фактором транскрипции, абсолютно необходимым для дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в

остеобласты. Osx представляет собой фактор транскрипции с доменом «цинковый палец», принадлежащий к SP-семейству транскрипционных факторов [1, 2]. YAP1 (yes-associated protein 1), также известный как YAP или YAP65, представляет собой белок, который действует как регулятор транскрипции, активируя транскрипцию генов, участвующих в пролиферации клеток, и подавляя апоптотические гены [4]. Было показано, что взаимодействие YAP с мотивом PY α A1 в значительной степени ответственно за стимуляцию транскрипции α A1-зависимого промотора, идентифицированного в гене остеокальцина. Предполагается, что α A1 использует YAP в качестве ко-активатора транскрипции во время процесса остеогенеза.

Материалы и методы исследования. В качестве линии мезенхимных стволовых клеток человека использовали МСК и нетрансформированную линию FetMSC из Коллекции культур клеток позвоночных (Институт цитологии РАН). Линия была выведена из стромальных клеток костного мозга 5-6 недельного эмбриона и охарактеризована по всем основным параметрам-минимальным требованиям Международного общества клеточной терапии, определяющим ее принадлежность к МСК [5].

В качестве базовой культуральной среды (БКС) для культивирования МСК использовали DMEM/F12 (Росмедбио, РФ) с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров (СЭК) (#SV30160.03, HyClone, США) 1% антибиотика (Penicillin-Streptomycin, #15140-122, Gibco, США) и 1% глутамина (BE17-605E/U1, Lonza, Швейцария). Клеточную линию культивировали в асептических условиях при контролируемых параметрах температуры (37°C), влажности (98%), состава газовой среды (5% CO₂). Клетки линии FetMSC рассеивали в лунки 24-луночных планшетов в количестве 100 тыс. и проводили культивирование в течение 7 и 14 суток в стандартных условиях. Объектом исследования являлся экспериментальный образец суспензии, содержащей факторы роста. Сухой образец белковых факторов весом 75 мг был разведен в 2,25 мл бессывороточной среды DMEM (Росмедбио, РФ) и профильтрован через фильтр с размером пор 22 мкм в асептических условиях. В результате была получена стерильная суспензия с концентрацией 33,33 мг/мл. Для исследования остеоиндуктивных свойств суспензию добавляли в БКС. Были изучены две концентрации – 0,66 мг/мл и 0,33 мг/мл.

В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные остеогенными растворимыми индукторами по протоколу Pittenger с соавторами [6]. Отрицательным контролем являлись клетки, растущие в БКС. Выявление экспрессии белков-факторов транскрипции Osterix, Runx2 и YAP1 в МСК человека проводили путем непрямого иммунофлуоресцентного мечения антителами к Runx2 (cbfa-1), YAP1 и Osterix. Оценку накопления факторов транскрипции МСК в процессе остеодифференцировки проводили при помощи программного комплекса ImageJ 1.51j8. Для выявления экспрессии генов-маркеров остеогенной дифференцировки была проведена ПЦР в реальном времени. В качестве референсных генов для проведения ПЦР были выбраны гены *PPIA* и *HPRT1*, кодирующие пептидилпролил изомеразу А и гипоксантин фосфорибозилтрансферазу 1, соответственно.

Результаты. С помощью иммунофлуоресцентного метода выявлено накопление белков-факторов транскрипции Osterix, Runx2 и YAP1 методом иммунофлуоресценции в клетках линии FetMSC при их росте в присутствии экспериментального образца суспензии, содержащей факторы роста клеточного происхождения, в ростовой среде (0,33 и 0,66 мг/мл) на 7 и 14 сутки культивирования. Установлена остеоиндуктивная активность (ОИ) при росте FetMSC в присутствии экспериментального образца

суспензии, содержащей факторы роста клеточного происхождения. Выявлены отличия в относительной флуоресценции по отношению к отрицательному контролю ($P < 0,05$):

- накопление фактора транскрипции Osterix (0,66 мг/мл суспензии, через 14 суток культивирования);
- накопление фактора транскрипции Runx2 (0,66 мг/мл суспензии, через 7 суток культивирования);
- накопление фактора транскрипции YAP1 (0,66 мг/мл суспензии, через 14 суток культивирования).

С использованием ПЦР в реальном времени в клетках линии FetMSC в разные сроки после воздействия суспензии, содержащей факторы роста клеточного происхождения, была выявлена дифференциальная экспрессия генов транскрипционных факторов остеогенеза *RUNX2* и *YAP1*. Во всех опытах экспрессия генов превышала значения отрицательного контроля (рост клеток в БКС). Максимальная экспрессия *RUNX2* наблюдалась на сроке 7 суток (по отношению к отрицательному контролю). Кроме того на сроках 3 и 7 суток – превышала значения положительного контроля – стандартного набора индукторов для остеогенеза. Экспрессия гена *YAP1* также превышала значения отрицательного контроля больше всего на 7 сутки культивирования. И в это же время показала превышение положительного – для состава БКС 0,66 мг/мл.

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о высоких остеоиндуктивных свойствах разработанной экспериментальной суспензии, содержащей факторы роста клеточного происхождения. В дальнейшем необходимо проведение анализа белкового состава суспензии и разработка стандартизированных синтетических факторов для улучшения эффективности остеогенной индукции стволовых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 14.575.21.0164, идентификатор RFMEFI57517X0164.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A.L., & Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation // Cell. – 1997. – Vol. 89. – P. 747-754.
2. Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., & de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation // Cell. – 2002. – Vol. 108. – P. 17-29.
3. Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development // Journal of Cellular Biochemistry. – 2011. – Vol. 112. – P. 750-755.
4. Yagi R., Chen L.F., Shigesada K., Murakami Y., & Ito Y. A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator // The EMBO Journal. – 1999. – Vol. 18. – P. 2551–2562.
5. Dominici M., Le Blank C., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., & Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8. – P. 315-317.
6. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., & Marshak D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 143-147.

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА И СВЕТОВОГО РЕЖИМА СЕВЕРО-ЗАПАДА
РОССИИ НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ОРГАНОВ СИРИЙСКОГО ХОМЯЧКА**

А.Д. Володина¹, А.В. Морозов², Е.П. Антонова²

Научный руководитель: д.б.н. В.А. Илюха²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Петрозаводский государственный университет»,

Россия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, 185000

²Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук»;

Россия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д.11 185910

E-mail: myshonog@rambler.ru

**EFFECTS OF EXOGENOUS MELATONIN AND RUSSIAN NORTH-WEST LIGHT
CONDITIONS ON ANTIOXIDANT STATUS OF ORGANS IN SYRIAN HAMSTER**

A.D. Volodina¹, A.V. Morozov², E.P. Antonova²

Scientific Supervisor: Dr. V.A. Ilyukha²

¹Petrozavodsk State University Russian, Petrozavodsk, 33, Lenin Street, 185910

²Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russian, Petrozavodsk, 11 Pushkinskaya Street, 185910

E-mail: myshonog@rambler.ru

Abstract. We studied the effects of exogenous melatonin (100 µg / day / animal) and the light conditions of North-West of Russia (NL) on antioxidant status of liver and small intestine in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). Female hamsters were exposed to a 12:12 light/dark cycle (LD) or NL for 3 months. In each light conditions hamsters were divided into two groups: LD-control, NL-control (received placebo); LD-mel, NL-mel (received melatonin). Animals kept in the NL conditions had decreased activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD) and catalase) as well as increased MDA level in the liver in comparison to control (LD). It was observed that in the small intestine the activities of SOD and catalase and the level of MDA were significantly higher in both NL groups in comparison to LD ones. Liver and small intestine MDA concentrations were decreased in NL-mel in comparison to NL-control. The present study revealed that exogenous melatonin was able to reduce the level of MDA and to change the activity of SOD and CAT in the light conditions of North-West of Russia.

Введение. На сегодняшний день существуют лишь фрагментарные данные по влиянию специфических световых условий Северо-Запада России (длинный световой день в весенне-летний период и короткий – в осенне-зимний период) на антиоксидантную защиту органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Известно, что фотопериодическая регуляция большинства физиологических функций у млекопитающих реализуется посредством модификации функционирования нейроэндокринного органа – пинеальной железы (ПЖ) и ее гормонов, важнейшим из которых является мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин). Мелатонин также играет важную роль в антиоксидантных

процессах, участвуя в качестве эндогенного акцептора свободных радикалов, и повышая активности и экспрессию антиоксидантных ферментов (АОФ) [1]. Антиоксидантные эффекты мелатонина выявлены в различных отделах ЖКТ так, например, он ускоряет заживление хронических язв желудка путем стимуляции микроциркуляции [2]. Эти факты могут свидетельствовать о том, что изменение физиологического уровня мелатонина способно отражаться на антиоксидантной защите органов и тканей пищеварительной системы от повреждающего действия АФК.

В связи с этим целью настоящего исследования было изучение влияния фотопериодических условий Северо-Запада России в сочетании с экзогенным мелатонином на антиоксидантную защиту печени и тонкого кишечника (ТК) у самок сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*). Исследовали активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, содержание восстановленного глутатиона (GSH), а также уровень соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных продуктов (ТБК-РП), в том числе и малонового альдегида (МДА) в тканях печени и тонкого кишечника.

Экспериментальная часть. Животные были рандомизированно разделены на 2 группы: контроль (LD) и опыт (смоделированное освещение Республики Карелия (NL)). Каждая группа была разделена на 2 подгруппы: хомяки 1-й подгруппы получали 5 раз в неделю с питьевой водой в ночное время мелатонин (100 мкг на животное) (LD+mel, NL+mel), 2-й - питьевую воду без мелатонина. Исследование проводили с периода летнего солнцестояния 25 июня (NL: 19.36 свет /4.24 темнота) (максимальной продолжительности дня в Карелии) до периода осеннего равноденствия – 25 сентября (NL: 12/12). Через один (NL: 18/6) и три месяца (NL: 12/12) эксперимента животных декапитировали и отбирали образцы крови и тканей печени и ТК (проксимальный отдел) для последующего анализа. Активность АОФ определяли спектрофотометрически: СОД по модифицированной адrenoхромной методике, каталазы – по количеству разложенной H_2O_2 , содержание GSH определяли по методу Элмана и выражали в мкмоль / г ткани. Активность ферментов рассчитывали на 1 мг белка. Уровень ТБК-РП, в том числе и МДА, как вторичного продукта ПОЛ, измеряли спектрофотометрически и выражали в мкмоль / г ткани. Полученные цифровые материалы обрабатывали с использованием пакетов статистических программ MS Excel и Statgraphics 2,0 общепринятыми методами статистики.

Результаты. Раскрытие потенциальных и адаптационных возможностей организма с помощью направленного воздействия различных внешне-средовых факторов является одним из приоритетных направлений экологической и экстремальной медицины. В ходе выполнения исследования была проведена оценка антиоксидантного статуса печени и ТК в различных световых режимах (LD, NL) и при введении экзогенного мелатонина у самок сирийского хомячка. Содержание животных в NL привело к снижению активности СОД ($6,63 \pm 0,23$) и каталазы ($11,03 \pm 0,9$) в печени на начальном этапе эксперимента по сравнению с контролем ($7,73 \pm 0,12$ и $13,72 \pm 0,96$ соответственно), однако по истечению 3-х месяцев, достоверных различий между изученными группами в активности СОД не было обнаружено. Также в результате проведенного исследования не было обнаружено достоверных изменений в содержании низкомолекулярного антиоксиданта GSH под воздействием фотопериодических условий Северо-Запада России. Уровень ПОЛ (оцениваемый по количеству ТБК-РП) в печени животных опытной группы (NL – $33,02 \pm 4,3$) был выше, чем у контрольных животных ($15,01 \pm 2,32$) на протяжении первого месяца эксперимента. При этом применение препарата мелатонина в NL режиме приводило к увеличению активности СОД в печени ($9,33 \pm 0,33$) и как следствие снижению уровня ТБК-РП ($3,23 \pm 2,34$).

Уменьшение продолжительности светового дня в изучаемый период в NL режиме могло привести к увеличению продукции пинеального мелатонина, который играет существенную роль в регуляции работы ЖКТ. Возможно, обнаруженное нами нивелирование различий между группами LD и NL в активности ферментов и содержании GSH связано со стабилизацией выработки мелатонина в исследуемый период в NL режиме. Печень является жизненно важным органом млекопитающих, который отвечает за многочисленные пищеварительные и экскреторные функции. Нарушение суточной цикличности синтеза мелатонина способно провоцировать увеличение продукции АФК и приводить к повреждению клеток печени. Исследования роли мелатонина в окислительном стрессе, метаболизме липидов и его потенциальном терапевтическом действии для профилактики и лечения травм и заболеваний печени являются перспективными [3].

В ТК хомячков обнаружено влияние световых режимов на активность АОФ: выявлено увеличение активности СОД как на начальном этапе ($2,43 \pm 0,35$), так и в первый месяц эксперимента ($2,79 \pm 0,39$), содержания GSH (25.07: $5,30 \pm 0,42$) и ТБК-РП (25.07: $14,13 \pm 0,04$, 25.09: $12,59 \pm 2,62$) и снижение каталазы в конце эксперимента (25.09: $0,13 \pm 0,005$) в NL по сравнению с LD (СОД: $1,65 \pm 0,009$ и $1,91 \pm 0,10$; GSH: $4,48 \pm 0,41$; ТБК-РП: $11,14 \pm 2,17$ и $1,92 \pm 0,83$; каталаза: $0,17 \pm 0,02$). Введение мелатонина оказало влияние почти на все исследуемые показатели в ТК, за исключением GSH. В первый месяц эксперимента активность СОД в LD+mel ($2,56 \pm 0,17$) была выше по сравнению с контролем ($1,91 \pm 0,10$), а в NL+mel ($2,45 \pm 0,25$) режиме, наоборот, наблюдалось снижение ее активности относительно уровня в NL ($2,79 \pm 0,39$). Активность каталазы в LD+mel снижалась ($0,07 \pm 0,02$), а в NL+mel ($0,017 \pm 0,03$) увеличивалась в сравнении с контролем (LD: $0,17 \pm 0,02$ и NL: $0,13 \pm 0,005$). Рассогласование ферментов антиоксидантной системы способно приводить к увеличению ПОЛ в ТК и к снижению функциональной активности данного участка ЖКТ. В результате применения мелатонина обнаружено достоверное снижение уровня ПОЛ в ТК в NL+mel (25.07: $4,82 \pm 1,31$, 25.09: $4,39 \pm 0,76$) относительно уровня в NL (25.07: $14,13 \pm 0,04$, 25.09: $12,59 \pm 2,62$), что указывает на усиление антиоксидантной защиты ТК хомячков в этом режиме.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о чувствительности антиоксидантной защиты в тканях печени и ТК к фотопериоду у сирийских хомячков. В фотопериодических условиях Северо-Запада России наблюдалось увеличение уровня ПОЛ в печени и ТК, однако введение экзогенного мелатонина оказало положительный эффект на изучаемую систему – выявлено снижение количества ТБК-РП в NL+mel режиме. Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук». Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221-2017-0052), а также при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 18-34-00035 мол_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karaaslan C., Suzen S. Antioxidant properties of melatonin and its potential action in diseases // Curr. Top. Med. Chem. – 2015– Vol. 15, № 9. – P. 894-903
2. Glenister R., McDaniel K., Francis H. Therapeutic actions of melatonin on gastrointestinal cancer development and progression // Transl Gastrointest Cancer. – 2013 – Vol. 2, № 1. – P. 11–20
3. Zhang J.-J., Meng X., Li Y., et al. Effects of Melatonin on Liver Injuries and Diseases // Int J Mol Sci. – 2017. – Vol., № 4. – P. 673.

КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ХРОНИЧЕСКОЙ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ

Н.С. Воронков, С.Ю. Цибульников

Научный руководитель: профессор, д.м.н. Л.Н. Маслов

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, НИИ кардиологии

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

E-mail: niks.voronkov@gmail.com

CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF CHRONIC COLD ADAPTATION

N.S. Voronkov, S.Y. Tsibul'nikov

Scientific Supervisor: Prof., PhD, L.N. Maslov

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

Russia, Tomsk, Kooperativnii str., 5, 634009

E-mail: niks.voronkov@gmail.com

Abstract. *The experiments were performed on Wistar male rats, which were subjected to continuous cold exposure (+4 °C, 4 weeks). It has been established that this exposure is not a chronic stress. It has been shown that prolonged cold impact causes adaptation to cold and has the infarct size-limiting effect.*

Введение. Феномен перекрёстной резистентности заключается в том, что после стрессорного воздействия возникает устойчивость не только к фактору, вызвавшему это состояние, но и к другим чрезмерным по силе раздражителям. Показано, что после адаптации организма к различным экстремальным воздействиям появляется перекрёстная резистентность к патогенному действию ишемии и реперфузии миокарда [1]. Однако не было известно, оказывает ли кардиопротекторный эффект непрерывная адаптация к холоду.

Цель работы — оценить инфаркт-лимитирующий эффект адаптации к непрерывному холодovому воздействию.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 53 крысах-самцах линии Wistar массой 200 - 220 г. Группа из 12 крыс круглосуточно содержались в холодильной камере при +4°C в течение 4-х недель [2]. В группу контроля включено 15 животных, содержащихся в стандартных условиях вивария. Через 24 часа после окончания холодovого воздействия крысам проводили коронароокклюзию (45 мин) и реперфузию (120 мин), для чего крыс наркотизировали α -хлоралозой (50 мг/кг, внутривенно) и подключали к аппарату искусственной вентиляции легких. Окклюзию левой нисходящей коронарной артерии проводили на 2 мм ниже её отхождения от аорты. После ишемии лигатуру ослабляли и восстановление кровотока подтверждали появлением эпикардальной гиперемии.

Выявление зоны некроза (ЗН) и области риска (ОР) проводили по методу J. Neekar и соавт. [3]. Областью риска принято назвать миокард, подвергшийся ишемии-реперфузии. После реперфузии сердце извлекали из грудной клетки и промывали через аорту физиологическим раствором. Для определения области риска лигатуру вновь затягивали и миокард окрашивали струйно через аорту 5% перманганатом калия. После чего изготавливали срезы миокарда левого желудочка толщиной в 1 мм перпендикулярно к продольной оси. Зона некроза выделялась из зоны риска путем окрашивания 1%

раствором 2,3,5-трифенилтетразолияхлорида (30 минут, 37°C), являющегося индикатором жизнеспособных клеток и тканей. Срезы помещали в 10% раствор формальдегида на сутки после чего сканировали с обеих сторон. Размер области риска и зоны некроза определяли компьютеризированным планиметрическим методом. Размер зоны некроза выражается в процентах от размера области риска, как соотношение ЗН/ОР.

В отдельную серию экспериментов было включено 12 адаптированных и 14 контрольных крыс, у которых определяли уровень гормонов, массу надпочечников, селезенки, тимуса. Одним из показателей адаптации к холоду у животных является относительное увеличение массы бурого жира [4], поэтому у адаптированных животных взвешивали межлопаточный бурый жир. После декапитации у крыс забирали кровь и центрифугировали (15 мин, 3000 об/мин). Измерение уровня кортикостерона проводили иммуноферментным методом, а измерение уровня кортизола радиоиммунным методом.

Количественные значения выражали как среднее арифметическое (М) ± стандартная ошибка среднего. Критерий Манна-Уитни использовали для определения достоверности влияния адаптации к холоду на соотношение ЗН/ОР, уровень гормонов, массу тела крыс и массу бурого жира.

Результаты. Установлено, что непрерывное воздействие холода (+4°C, 4 недели) вызывает двукратное увеличение массы бурого жира в сравнении с интактными животными (Табл. 1). Как известно бурый жир играет важную роль в термогенезе и акклиматизации к холоду, а увеличение массы бурой жировой ткани является показателем адаптации к холодовому воздействию. Мы обнаружили, что при непрерывном воздействии холода масса надпочечников увеличилась на 40% по сравнению с интактными животными. Уровни кортизола и кортикостерона в сыворотке крови при этом не изменились, инволюции тимуса и изменений массы селезенки и сердца не наблюдалось (Табл. 1). Наши данные свидетельствуют, что у крыс действительно формируется адаптация к холоду и длительное холодовое воздействие не является хроническим стрессом.

Таблица 1

Морфологические показатели стресс-реакции у крыс

Группы крыс	Масса крыс, г	Масса тимуса, мг	Масса надпочечников, мг	Масса селезенки, мг	Кортикостерон, нМоль/л	Кортизол, нМоль/л	Масса бурого жира, мг
Контроль (n=14)	282,6 ± 9,3	240,5 ± 13,2	35,6 ± 2,1	1059,5 ± 96,1	2568,5 ± 93,3	58,3 ± 12,2	300,4 ± 38,2
Холод (n=12)	264,8 ± 3,6	217 ± 12,9	49,7 ± 2*	933,8 ± 45,2	2587,3 ± 91,4	47,1 ± 6,1	764,6 ± 30,5*

Примечания: n – количество животных в группе; * - статистически значимые различия по сравнению с группой контроля (при $p < 0,01$).

Как можно видеть на графике (Рис. 1), у крыс, подвергнутых холодовому воздействию, индекс ЗН/ОР был достоверно ниже на 30 % по сравнению с контрольной группой. Следовательно, адаптация к непрерывному воздействию холода оказывает инфаркт-лимитирующий эффект.

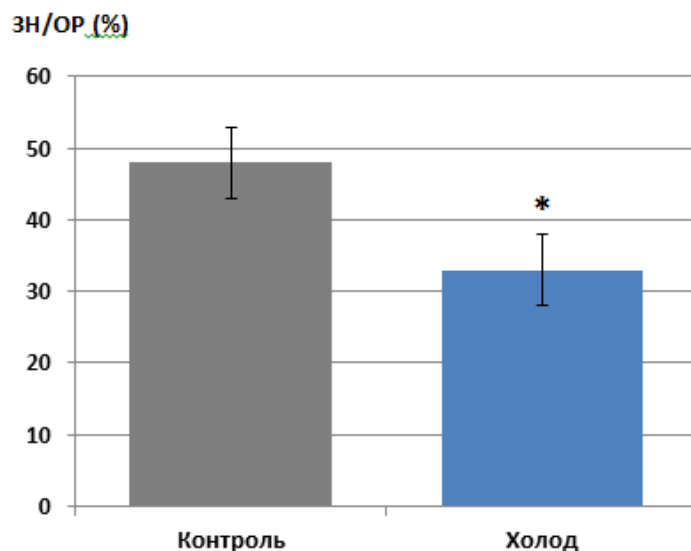


Рис. 1. Влияние непрерывной холодной адаптации на соотношение зоны некроза к области риска в миокарде крыс ($p < 0,05$)

Заключение. Таким образом, нами было установлено, что непрерывное воздействие холода (+4°C, 4 недели) вызывает адаптацию к холоду, оказывает инфаркт-лимитирующий эффект и не является хроническим стрессом. Однако механизм кардиопротекторного действия адаптации к холоду остаётся неизвестен. Мы предполагаем, что он может быть связан с увеличением плотности β_3 -адренорецепторов в миокарде в ответ на длительное непрерывное холодное воздействие. Действительно, имеются данные о том, что введение адреномиметиков подопытным животным перед коронароокклюзией может оказывать инфаркт-лимитирующий эффект [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meerson F. Z. et al. Animal resistance to sublethal hypoxia may be raised more by adaptation to stress than by adaptation to hypoxia // Bull. Exp. Biol. Med. – 1993. – vol.116, № 6. – P. 1467-1471.
2. Kvetnansky R., Ukropec J., Laukova M., Manz B., Pacak K., Vargovic P. Stress stimulates production of catecholamines in rat adipocytes // Cell. Mol. Neurobiol. – 2012. – vol. 32 № 5. – P. 801-813.
3. Neckar J., Szarszoi O., Herget J., et al. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia // Physiol. Res. – 2003. – vol. 52. – P. 171-175.
4. Lim S., Honek J., Xue Y. et al. Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice // Nat. Protoc. – 2012. – vol.7, № 3. – P. 606-615.
5. Khaliulin I., Halestrap A.P., Suleiman M.S. Temperature preconditioning is optimal at 26° C and confers additional protection to hypothermic cardioplegic ischemic arrest // Exp. Biol. Med. – 2011. – vol. 236, № 6. – P. 736-745.

**ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРА
ДОФАМИНА-D2 (*DRD2*) И *DISC1* С ШИЗОФРЕНИЕЙ**

А.А. Глухова¹, И.В. Пожидаев^{1,2}

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

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

²НИИ психического здоровья Томского НИМЦ,

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

E-mail: richard.nilson@mail.ru

**THE STUDY OF ASSOCIATION OF POLYMORPHIC VARIANTS OF DOPAMINE RECEPTOR
AND DISC1 GENES IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA**

A.A. Gluhova¹, I.V. Pozhidaev^{1,2}

Scientific Supervisor: Prof., M.D. S.A. Ivanova

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

²Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Aleutskaya st., 4, 634014

E-mail: richard.nilson@mail.ru

Abstract: *A lot of studies about genetics of schizophrenia are aimed to identifying possible candidate genes and their polymorphic variants. Validation of functional polymorphic variants can improve personalized medicine and make drug administration more effective. Our study presents the results about association of polymorphic variants of dopamine receptor gene and DISC1 gene with schizophrenia and positive and negative symptoms in schizophrenia patients. We did not find significant associations in the population of patients from the Siberian region. Further studies are needed to identify genetic markers of the disease.*

Введение. Шизофрения представляет собой тяжелое психическое расстройство, с частотой встречаемости среди населения мира ~1%, развивается, как правило, в подростковом или раннем взрослом возрасте, и сопровождается различными симптомами [1, 2].

Шизофрения относится к мультифакториальным заболеваниям, для которых характерен существенный вклад генетической компоненты. Генетическую архитектуру шизофрении определяют аллели, мультипликативно взаимодействующие между собой. Ген *DRD2* (Dopamine receptor D2) участвует в передаче электрического импульса между нейронами, является терапевтической мишенью действия нейролептиков [3]. Ген *DISC1* (Disrupted-In-Schizophrenia-1) принимает участие в процессах нейрогенеза (пролиферации, дифференцировки, миграции нейронов), синаптической регуляции и может играть важную роль в патогенезе шизофрении [4].

Целью исследования было изучение частот полиморфных вариантов генов-кандидатов *DRD2* и *DISC1* у пациентов с шизофренией и здоровых лиц, а также анализ их ассоциации с позитивной и негативной симптоматикой. В ходе исследования были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать частоту полиморфных вариантов генов *DRD2* (rs4245147, rs134655, rs6277, rs1076560) и *DISC1* (rs821616) у пациентов с шизофренией и в группе контроля и их ассоциацию с риском развития данного заболевания.

2. Оценить потенциальный эффект генотипов в отношении позитивных и негативных симптомов в группе пациентов с шизофренией.

Экспериментальная часть. В исследование было включено 470 пациентов (этнически русские, средний возраст $42,1 \pm 1,4$, от 18 до 77 лет включительно) с диагнозом параноидной шизофрении. Диагностика позитивных и негативных симптомов проводилась с использованием шкалы PANSS. Контрольная группа (n=221) была сопоставима по половозрастным характеристикам с группой пациентов. ДНК выделяли из венозной крови по протоколу стандартного фенол-хлороформного метода. Генотипирование проводили с помощью метода ПЦР в реальном времени. Были выбраны следующие полиморфные варианты для анализа: rs4245147, rs134655, rs6277, rs1076560, rs821616.

Результаты. Не была выявлена ассоциация изученных полиморфных вариантов с шизофренией. Распределение частот полиморфных вариантов генов *DRD2* и *DISC1* не отличалось от ожидаемого распределения по Харди-Вайнбергу: rs4245147 ($\chi^2 = 2,966$; $p = 0,227$); rs134655 ($\chi^2 = 2,375$; $p = 0,305$); rs6277 ($\chi^2 = 1,836$; $p = 0,399$); rs1076560 ($\chi^2 = 0,421$; $p = 0,810$), rs821616 ($\chi^2 = 0,899$; $p = 0,640$). Значения отношения шансов (OR) с указанием 95%-го доверительного интервала не позволили сделать однозначного заключения об ассоциации изучаемых маркеров с патологией.

Сравнительный частотный анализ продемонстрировал численное превосходство пациентов с позитивной симптоматикой. Наибольшие численные показатели приходились на долю гомозигот по аллелю дикого типа, а также на гетерозигот для полиморфных вариантов rs4245147, rs134655, rs1076560, rs821616. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Сравнение генотипов полиморфных вариантов генов *DRD2* и *DISC1* с позитивной и негативной симптоматикой

Полиморфные варианты	Аллели и генотипы	Пациенты с позитивной симптоматикой, %	Пациенты с негативной симптоматикой, %	OR		χ^2	p
				знач.	[95% CI]		
(DRD2) rs4245147	CC	48 (19,9%)	25 (13,7%)	1,56	0,92 – 2,65	3,94	0,14
	CT	102 (42,3%)	92 (50,5%)	0,72	0,49 – 1,06		
	TT	91 (37,8%)	65 (35,7%)	1,09	0,73 – 1,63		
	C	99 (41,1%)	71 (39,0%)	1,09	0,83 – 1,44	0,37	0,54
	T	142 (58,9%)	111 (61,0%)	0,92	0,69 – 1,21		
(DRD2) rs134655	CC	77 (33,9%)	52 (31,3%)	1,13	0,73 – 1,73	1,46	0,48
	CG	119 (52,4%)	84 (50,6%)	1,08	0,72 – 1,61		
	GG	31 (13,7%)	30 (18,1%)	0,72	0,41 – 1,24		
	C	136 (60,1%)	95 (56,6%)	1,16	0,87 – 1,54	0,97	0,32
	G	91 (39,9%)	71 (43,4%)	0,87	0,65 – 1,15		

(DRD2) rs6277	CC	72 (30,0%)	46 (25,3%)	1,27	0,82 – 1,95	1,57	0,46
	CT	117 (48,8%)	90 (49,5%)	0,97	0,66 – 1,43		
	TT	51 (21,3%)	46 (25,3%)	0,08	0,51 – 1,26		
	C	130 (54,4%)	91 (50,0%)	1,19	0,91 – 1,57	1,59	0,21
	T	110 (45,6%)	91 (50,0%)	0,84	0,64 – 1,10		
(DRD2) rs1076560	CC	151 (66,5%)	117 (70,9%)	0,82	0,53 – 1,26	1,55	0,46
	CA	64 (28,2%)	43 (26,1%)	1,11	0,71 – 1,75		
	AA	12 (5,3%)	5 (3,0%)	1,79	0,62 – 5,17		
	C	184 (80,6%)	139 (83,9%)	0,80	0,55 – 1,16	1,43	0,23
	A	43 (19,4%)	26 (16,1%)	1,26	0,86 – 1,83		
(DISC1) rs821616	AA	64 (51,2%)	54 (53,5%)	0,91	0,54 – 1,54	2,04	0,36
	AT	53 (42,4%)	36 (35,6%)	1,33	0,77 – 2,28		
	TT	8 (6,4%)	11 (10,9%)	0,56	0,22 – 1,45		
	A	90 (72,4%)	72 (71,3%)	1,06	0,70 – 1,60	0,07	0,79
	T	35 (27,6%)	29 (28,7%)	0,95	0,63 – 1,43		

Примечания: χ^2 – хи-квадрат, p-value – уровень статистической значимости, OR – отношение шансов (odds ratio); [95 % CI] – 95% доверительный интервал.

Выводы. Анализ частот полиморфных вариантов генов *DRD2* и *DISC1*, проведенный на популяции больных шизофренией Сибирского региона, не подтвердил их вовлеченность в патогенез шизофрении и формирование ведущей клинической симптоматики. Необходимы дальнейшие исследования для идентификации маркёров риска и симптоматики шизофрении.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Интеграционного проекта СО РАН №30 «Комплексный подход для создания антипсихотиков нового поколения» (2018-2020).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tandon R., Keshavan M., Nasrallah H. (2008). Schizophrenia, "Just the Facts" What we know in 2008. Part 1: Overview [Electronic version]. Schizophrenia Research, no. 100, pp. 4–192.
2. Корнетова Е. Г., Семке А. В., Корнетов А. Н., Иванова С. А., Лобачева О. А., Семенюк К. А., Бойко А. С., Бохан Н. А. Шизофрения: биопсихосоциальная модель и конституционально-биологический подход. – Томск: Изд-во ООО «Интегральный Переплет», 2018. – 174 с.
3. Османова Д. З., Тигунцев В. В., Михалицкая Е. В., Пожидаев И. В., Вялова Н. М., Стегний В. Н. Роль генов дофаминовых рецепторов в клиническом полиморфизме шизофрении, ответе на фармакотерапию и антипсихотик-индуцированных побочных эффектах // Научное обозрение. Биологические науки. – 2018. – № 5. – С. 22–27.
4. Липина Т. В. Вклад точечной мутации гена DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia-1) в патогенез шизофрении: экспериментальное исследование: дис. на соискание ученой степени д-ра. биол. наук. – Нск., 2018. – 204 с.

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЖИРОВОЙ ТКАНИ
ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ОРБИТАЛЬНОЙ КУЛЬТИ *IN VIVO***

Е.А. Горбунова, Е.О. Филиппова

Сибирский Государственный Медицинский Университет

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

E-mail: katerinabosix@mail.ru

**MORPHOLOGICAL FEATURES OF FORMATION OF FAT TISSUE
FOR ORBITAL STUMP *IN VIVO***

E.A. Gorbunova, E.O. Filippova

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovskii tr., 2, 634050

E-mail: katerinabosix@mail.ru

Abstract. *The purpose of this study is to study the morphological features of the musculoskeletal stump formation with the adipose tissue previously isolated from rat's abdominal cavity. Studies performed on 18 Wistar rats. The animals were enucleated from one of the eyes, followed by the formation of the musculoskeletal stump using an implant 5 mm in diameter from adipose tissue previously isolated from the abdominal cavity of the rat. Morphological analysis showed that the fat implant undergoes destructive necrotic changes due to its poor blood supply.*

Введение. Удаление глазного яблока вследствие тяжелых патологических состояний глаза является нередкой операцией в современной офтальмологии. В то же время, это серьезная реконструктивная операция, вследствие которой возникает выраженный дефицит объема тканей, для восполнения которого необходимо поместить в орбиту имплантат из инертного биосовместимого материала. К настоящему времени существует целый ряд материалов, предлагаемых в качестве орбитального имплантата. Некоторые из них - такие как хрящ, гидроксипатит, углеродные композиты достаточно широко применяются в орбитальной хирургии, другие же, например, тантал, керамика, монокристаллический силикон, имеют ограниченное применение как из-за высокой стоимости, так и большого числа осложнений [1]. Среди биологических имплантатов чаще всего для трансплантации используют жировую ткань, которая активно применяется в регенеративной медицине для восполнения дефектов мягких тканей или органов [2].

Цель исследования – в эксперименте *in vivo* изучить морфологические особенности формирования опорно-двигательной культы глазного яблока с помощью жировой ткани, предварительно выделенной из абдоминальной полости крыс и помещенной в склеральный мешок глазного яблока.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование выполнено на 18 половозрелых крысах-самцах породы Wistar весом 200-250 г. (заключение этического комитета № 1715 от 29.11.2010 г.). Всех животных содержали в условиях вивария на стандартной диете, предусматривающей свободный доступ к воде и пище. Содержание и все манипуляции, которым подвергались животные, проводили с соблюдением правил и норм Европейского общества (86/609ЕЕС) и Хельсинской декларации.

В условиях операционной под наркозом животным выполняли эвисцерознуклеацию одного из глаз с последующим формированием опорно-двигательной культы глаза с помощью имплантата

диаметром 5 мм из жировой ткани, предварительно выделенной из абдоминальной полости крысы, и помещали в склеральный мешок глазного яблока.

Продолжительность эксперимента составила 21 сутки. В послеоперационном периоде всем животным в конъюнктивальную полость оперированного глаза закапывали раствор Тобрамицина 6 раз в день. На 7, 14, 21 сутки после операции из эксперимента выводили по 6 крыс с удалением опорно-двигательной культи оперированного глазного яблока. Полученный в ходе экспериментов материал фиксировали для световой и электронной микроскопии. Для электронно-микроскопического исследования приготавливали ультратонкие срезы из кусочков орбитальной культи толщиной 60 - 100 нм на ультротоме "Ultrotome III" ("LKB", Швеция). Изучение ультраструктуры проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии на электронном микроскопе "JEM-100 CXII" ("JEOL", Япония) с апертурной диафрагмой 25 - 30 мкм при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Результаты. Во все сроки наблюдения после оперативного вмешательства у животных не было выявлено послеоперационных осложнений, связанных с орбитальной имплантацией (миграция, обнажение или отторжение имплантата).

При световой микроскопии полутонких срезов у животных на 7 сутки после операции наблюдалось скопление адипоцитов, между которыми определялось плохо структурированное межклеточное вещество с тонкими коллагеновыми волокнами и единичными новообразованными сосудами. Клеточность низкая, клетки преимущественно имели морфологию мононуклеарных и полинуклеарных лейкоцитов. На 14-е сутки среди адипоцитов встречались клетки макрофагального ряда и фибробластического дифферона, между которыми наблюдалось плохо структурированное межклеточное вещество, состоящее из фрагментов разрушенных жировых клеток. Местами визуализировались истонченные коллагеновые волокна и единичные новообразованные сосуды. На 21-е сутки после операции между адипоцитами встречались фибробластоподобные клетки, рыхлая соединительная ткань с тонкими коллагеновыми волокнами и единичные умеренно полнокровные сосуды.

Электронная микроскопия показала, что на 7-е сутки у животных наблюдались преимущественно адипоциты, которые имели однотипную организацию цитоплазмы с довольно крупными липидными каплями. Цитозоль между каплями мелкозернистая, умеренно электроплотная. Микровезикулы и другие органеллы в цитоплазме плохо различимы. Между адипоцитами встречались макрофагальные клетки с крупным ядром, содержащим крупно- и мелко- глыбчатый гетерохроматин, ядрышко с плохо различимым фибриллярным компонентом. В цитоплазме макрофагов присутствовали везикулярные структуры, крупные вакуоли с гетероморфным содержимым. Между макрофагами и адипоцитами визуализировались пучки коллагеновых фибрилл с нерегулярной, часто слабо выраженной исчерченностью, единичные капилляры с эритроцитами в просвете.

На 14-е сутки на электронограмме встречались преимущественно адипоциты с однотипной организацией цитоплазмы и крупными липидными каплями. Между адипоцитами - фрагменты клеток с выраженными деструктивными изменениями (светлая цитоплазма, малочисленные оптически пустые мембранные структуры, нарушение строения ядра, гетерохроматин в виде крупных глыбок-агрегатов). Фибробласты обнаруживались с множественными микровезикулами, расширенной гранулярной

эндоплазматической сети, выраженным эухроматином в ядре. Вокруг фибробластов – неупорядоченные пучки коллагеновых фибрилл. Эндотелиоциты капилляров содержали микровезикулы.

На 21 сутки после операции по данным электронной микроскопии между адипоцитами обнаружены фрагменты клеток с выраженными деструктивными изменениями (разрушения мембранных и немембранных органелл, аутофагосомы, нарушено распределение гетерохроматина). Определялись пучки коллагеновых фибрилл с нерегулярной, часто слабо выраженной исчерченностью. Эндотелиоциты капилляров без деструктивных изменений. В просвете сосудов – эритроциты.

Многие исследователи причиной дистрофических и некротических изменений жировых имплантатов считают их недостаточное кровоснабжение [3, 4, 5]. Особенно это касается клеток, расположенных в центральной зоне имплантата. Недостаточное кровоснабжение снижает доставку кислорода и питательных веществ к центральным адипоцитам, что приводит к ишемии и дальнейшим деструктивно-некротическим процессам [3, 4]. Для решения данной проблемы многие авторы предлагают при трансплантации жировой ткани внутрь имплантата вводить стволовые клетки жировой ткани, которые имеют большое сходство с мезенхимальными клетками костного мозга. Обогащение жировой ткани стволовыми клетками приводит к уменьшению некроза в центральной зоне и способствует неоваскуляризации [5].

Заключение. Таким образом, морфологический анализ формирования опорно-двигательной культуры глазного яблока с помощью жировой ткани показал, что жировой имплантат, предварительно выделенный из абдоминальной полости крыс и помещенный в склеральный мешок глазного яблока, подвергается деструктивно-некротическим изменениям вследствие его слабого кровоснабжения.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, Федеральной целевой программы (соглашение № 14.575.21.0140, уникальный идентификатор RFMEFI57517X0140).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бараш А.Н., Шаршакова Т.М., Малиновский Г.Ф. Медико-социальные проблемы при анофтальмическом синдроме // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – Т. 44, № 2. – С. 4–7.
2. Старцева О.И., Мельников Д.В., Захаренко А.С., Кириллова К.А., Иванов С.И., Пищикова Е.Д., Даштоян Г.Э. Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани: современный взгляд, актуальность и перспективы применения в пластической хирургии // Исследования и практика в медицине. – 2016. – Т. 3, № 3. – С. 68–75.
3. Pu L.L. Mechanisms of Fat Graft Survival // Annals of Plastic Surgery. – 2016. – № 77. – P. 84–86.
4. Yoshimura K., Sato K., Aoi N., Kurita M. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells // Aesthetic Plastic Surgery. – 2008. – № 32. – P. 48–57.
5. Moustaki M., Papadopoulou O., Verikokos C., Karypidis D., Masud D., Kostakis A., Papastefanaki F., Roubelakis M.G., Perrea D. Application of adipose-derived stromal cells in fat grafting // Basic science and literature review. – 2017. – № 14. – P. 2415–2423.

**ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИОКАРДА
И АКТИВНОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ
КАРДИОСКЛЕРОЗА У КРЫС**

А.А. Гороховский, А.В. Васильев

Научный руководитель: н.с., к.м.н. Т.Ю. Реброва

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

E-mail: alegorohovs@yandex.ru

**AGE PECULIARITIES OF THE FUNCTIONAL STATE OF THE MYOCARDIUM AND THE
ACTIVITY OF LIPID PEROXIDATION IN THE FORMATION OF CARDIOSCLEROSIS IN RATS**

A.A. Gorokhovskiy, A.V. Vasilev

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

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

E-mail: alegorohovs@yandex.ru

***Abstract.** The following article describes the study of the features of myocardial remodeling of rats 4, 12, 24 months of age in terms of post-infarction cardiosclerosis. During the experiment we used rats artificially subjected to occlusion of the coronary artery. It was detected an increase in the excitability of the heart muscle in the rats of 24 monthly age and disability of sarcoplasmic reticulum to accumulate was predominantly in 4 monthly animals. It was found that the activation of free radical processes in myocardial tissue increases with age. The greatest activation of free radical oxidation of lipids is observed in 4 monthly individuals.*

Введение. Формирование постинфарктного кардиосклероза (ПИКС) и связанное с ним ремоделирование миокарда является типичным исходом перенесенного острого инфаркта миокарда. Процесс ремоделирования может продолжаться еще длительно после формирования постинфарктного рубца и определять прогноз последующего течения постинфарктного периода, в частности возможность развития хронической сердечной недостаточности. Наряду со структурными изменениями, развивается сократительная дисфункция миокарда, происходит нарушение энергообеспечения кардиомиоцитов, снижается активность антиокислительных ферментов, активируется перекисное окисление липидов (ПОЛ).

Изменения метаболизма миокарда в постинфарктном периоде носят возрастзависимый характер, в настоящее время актуальным является изучение механизмов реализации возрастных особенностей на клеточном уровне.

Цель работы заключалась в исследовании особенности изменения инотропных реакций миокарда и содержания продуктов ПОЛ при ПИКС у животных возрастом 4,12 и 24 месяца.

Материалы и методы исследования. Исследования были выполнены на белых крысах-самцах линии Wistar, возрастом 4, 12 и 24 месяцев, в каждой возрастной группе были выделены контрольная и опытная подгруппы. Животным опытных подгрупп моделировали инфаркт миокарда при помощи

коронароокклюзии путем наложения лигатуры в области верхней трети левой нисходящей коронарной артерии. Операционную рану зашивали и животных содержали в стандартных условиях вивария в течение 45 суток. По истечении этого срока формировался ПИКС. Контролем служили животные соответствующего возраста, которым была выполнена ложная операция без коронароокклюзии.

Сократительную функцию миокарда оценивали по изменению инотропного ответа изолированных перфузируемых папиллярных мышц левого желудочка крыс. Перфузию мышц осуществляли в термостабилизированной проточной камере при 36,5°C оксигенированным (O_2 – 95%, CO_2 – 5%) раствором Кребса-Хензелята [1,2,3]. Ответ папиллярных мышц измеряли в изометрическом режиме, а его регистрацию и обработку проводили на компьютере с использованием программы MuscleData.

Интенсивность перекисного окисления липидов в гомогенатах миокарда всех экспериментальных групп животных оценивали в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), измеряя концентрацию ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) [4]. Уровень ДК оценивали спектрофотометрически в гексановых экстрактах ткани миокарда [5].

Достоверность различий данных оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых выборок. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Экстрасистолический ответ был получен при нанесении внеочередного стимула при минимальном интервале нанесения внеочередного стимула 0,20 с в подгруппе 12 мес. интактных животных и подгруппах 12 и 24 мес. животных с ПИКС. При увеличении интервала до 0,225с экстрасистолический ответ получен во всех подгруппах, кроме животных возрастом 4 месяца с ПИКС.

Установлено, что величина внеочередного сокращения (ВС) у животных с кардиосклерозом статистически значимо превышала аналогичные значения у интактных животных в возрастной подгруппе в интервалах длительностью 0,50с и более у животных возрастом 4 мес. возраста; 0,25 с и более – у животных 12 мес. В группе животных 24 мес. возраста с ПИКС величина ВС была ниже показателей у интактных животных.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что у животных 4 месячного возраста формирование ПИКС приводит к снижению возбудимости сарколеммальной мембраны, в то время как для сарколеммы кардиомиоцитов 12 и 24 месячных животных с ПИКС характерна повышенная возбудимость.

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

Анализ постэкстрасистолических сокращений показал, что у 4 мес. животных с ПИКС эффект постэкстрасистолической потенциации при интервалах 0,2-0,25 с был достоверно ниже, чем в группе интактных животных этого возраста. У 12 мес. животных эффект постэкстрасистолической потенциации при экстрасистолических интервалах 1,25 и 1,5 с был достоверно выше, чем в группе интактных

животных этого возраста. В возрастной группе 24 мес эффект постэкстрасистолической потенциации не имел статистически значимых различий у интактных животных и животных с ПИКС.

Одним из механизмов нарушения целостности мембран и изменения их электрических свойств является активация свободно радикальных процессов в липидах. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в гомогенатах миокарда интактных крыс возрастом 4, 12 и 24 месяцев характеризуется возрастной тенденцией к усилению наработки в ткани миокарда ТБК-АП соответственно 2,98; 5,26; 6,18 мкмоль/гр ткани и ДК. 0,41; 0,93; 2,04 ΔD_{232} / гр ткани. Такой результат свидетельствует о том, что с увеличением возраста у животных увеличивается активность процессов ПОЛ. Моделирование ПИКС приводило к дополнительному увеличению содержания в миокарде продуктов перекисного окисления липидов. В группе 4 месячных животных было отмечено наибольшее повышение образования ТБК-АП в 3,7 раза (до 10,99 мкмоль/гр). У животных возрастом 12 и 24 месяца ТБК-АП в ткани миокарда повысились в 2,5 (до 13,31 мкмоль/гр) и 2,1 (до 12,90 мкмоль/гр) раза соответственно. Увеличение образования ДК при моделировании ПИКС было отмечено в группе 4мес. животных до 0,66 ΔD_{232} / гр ткани. В группе 24 мес. животных при моделировании ПИКС было отмечено снижение образования ДК до 1,81 ДК ΔD_{232} / гр ткани. У животных возрастом 12 месяца изменения этого показателя были недостоверными.

Выводы. Постинфарктное ремоделирование миокарда зависит от возраста. Миокард животных возрастом 24 месяца в условиях экспериментального ПИКС характеризуется повышением возбудимости, тогда как в миокарде 4 месячных животных отмечается нарушение способности саркоплазматического ретикулума аккумулировать и удерживать ионы кальция.

С возрастом в ткани миокарда происходит активация свободнорадикальных процессов. Наибольшая активация свободно-радикального окисления липидов при формировании ПИКС наблюдается у 4 месячных особей, что требует наибольшего ответа со стороны системы антиоксидантов. У животных возрастом 12 и 24 месяца базово высокий уже в интактном состоянии уровень ПОЛ, при развитии ПИКС увеличивается в меньшей степени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ponikowski P., Voors A.A., Anker S.D. et all. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure // *European Heart Journal*. – 2016. – №. 37. – P. 2129-2200.
2. Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С. Активность перекисного окисления липидов и функциональное состояние миокарда при ремоделировании сердца крыс после экспериментального инфаркта // *Кардиология*. – 2007. – Т. 47., №6. – С. 41-45.
3. Yano M., Ikeda Y., Matsuzaki M. Altered intracellular Ca^{2+} handling in heart failure // *Journal Clin. Invest.* – 2005. – №115(3). – P. 556-564.
4. Коробейникова Э. Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой // *Лабораторное дело*. – 1989. – № 7. – С. 8-10.
5. Bolland J.L., Koch H.P. The course of antioxidant reaction in polyisoprenes and allied compounds. Part IX. The primary thermal oxidation product of ethyl linoleate // *Journal. Chem. Soc.* – 1945. – № 7. – P. 445.

**CNA-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЛАНДШАФТ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СЛУЧАЯХ
ФЕНОМЕНА ГЕНЕТИЧЕСКОГО «ЗАМИРАНИЯ» ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ
ХИМИОТЕРАПИИ**

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

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН,

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

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

E-mail: ivderyusheva@gmail.com

**CNA-GENETIC LANDSCAPE OF BREAST CANCER IN CASES OF PHENOMENON OF GENETIC
“FADING” DURING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY**

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

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

Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Russia, Tomsk, Kooperativny str. 5, 634050

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

E-mail: ivderyusheva@gmail.com

Abstract. *When studying CNA changes (Copy Number Aberration) of the genetic landscape in a breast tumor during neoadjuvant chemotherapy (NAC), it was found that in some patients no genetic changes occur in the tumor, despite the wide range of changes in tumor volume under the action of NAC. We called this phenomenon - the phenomenon of genetic "fading." It has been established that in some patients with the phenomenon of "fading" metastases develop and "fading" turns out to be unstable, in some patients "fading" is stable and metastases do not develop for at least 5 years. In 8 (19%) patients of 42 patients, the formation of new clones with amplifications and deletions and a high frequency of metastasis (75%) were noted. In 18/42 patients (43%), there was a decrease in the frequency of deletions and amplifications in the tumor under the influence of NAC and the frequency of metastasis 1/18 (5.6%). The phenomenon of genetic "fading" was observed in 16/42 patients (38%). 5 of these patients (31%) developed metastases, i.e. the phenomenon of "fading" was unstable. In general, CNA-genetic tumor landscape in patients with the phenomenon of "fading" is characterized by a low frequency of amplifications and deletions, compared with all other patients. Patients with an unstable "fading" phenomenon are characterized by the presence of amplifications in the tumor regions 5q31.1-34, 19q13.41, and deletions 12p13.33-12p11.22.*

Актуальность. Неоадьювантная химиотерапия (НАХТ) является одним из признанных методов системной терапии и может использоваться при многих опухолевых локализациях, в том числе и при раке молочной железы. В наших предыдущих исследованиях [1] из изменений CNA-генетического ландшафта (Copy Number Aberrations – aberrации числа копий) опухоли молочной железы в процессе НАХТ было показано три типа генетического ответа опухоли на химиотерапию. Установлено, что в процессе химиотерапии у 40% больных уменьшалось количество мутантных опухолевых клонов (вплоть до полной элиминации: 4 случая полной генетической регрессии опухоли), в 40% случаев химиотерапия не

оказывала никакого влияния на количество мутантных клонов и частоту CNA. У 20% больных наблюдались случаи появления в процессе предоперационной химиотерапии клонов, несущих новые амплификации. В 100% случаях элиминация мутантных в процессе НАХТ была сопряжена с безметастатической выживаемостью, а индукция амплификаций под действием НАХТ приводила почти к 100% метастазированию. Соответственно у 40% больных не было генетических изменений опухоли в процессе НАХТ, несмотря на вариабельность изменения объема опухоли под действием НАХТ. Мы назвали этот феномен – отсутствие генетических изменений в опухоли под действием НАХТ – феноменом генетического «замирания». Установлено, что у части пациентов с феноменом «замирания» метастазы развиваются и «замирание» оказывается неустойчивым, у части больных «замирание» устойчивое и метастазы не развиваются, как минимум в течении 5 лет.

Целью нашей работы явилось изучение особенностей CNA-генетического ландшафта у больных с феноменом устойчивого и неустойчивого генетического «замирания» опухоли.

Материалы и методы. В исследование были включены 42 больных люминальным В РМЖ II–IIIВ стадии, получавшие 4–8 курсов НХТ по схемам FAC, AC, CAH, таксотер в монорежиме, CP, AT с последующим хирургическим лечением (в объеме радикальной мастэктомии, органосохранной операции или подкожной мастэктомии с одномоментной пластикой). В послеоперационном периоде больным назначались адъювантная химиотерапия, обязательно гормональное лечение и лучевая терапия по показаниям. В качестве исследуемого материала был использован биопсийный опухолевый материал до и после проведения НХТ, из которого, в дальнейшем, выделяли ДНК и РНК. Для оценки CNA-генетического ландшафта проведен микроматричный анализ опухоли до лечения и после НХТ на ДНК-чипах Affymetrix CytoScan™ HD Array на микрочиповой системе Affymetrix GeneChip™ Scanner 3000.

Результаты. Было проведено микроматричное исследование копийности всех известных генов в опухоли до лечения и после НАХТ у 42 больных. При оценке изменений CNA-генетического ландшафта опухоли в процессе НАХТ выявлены случаи феномена генетического «замирания» опухоли - 16/42(38%). У 5 из 16 пациентов установлено развитие гематогенных метастазов, т.е. наблюдается неустойчивое генетическое «замирание». Стоит отметить, что у всех 5 больных есть две и более амплификаций генов стволовости. У 11 пациентов наоборот метастазы не развились в течение 5 лет, т.е. наблюдается устойчивое «замирание». У 6 пациентов отсутствуют амплификации генов стволовости и поэтому стволовой переход у них маловероятен и метастазы не развились по этой причине. У 5 пациентов имеются амплификации генов стволовости, опухолевые клетки этих больных способны к стволовому переходу и могут метастазировать, но они не метастазировали. Причина этого неизвестна.



Рис.1. Пример феномена генетического «замирания»

Далее была оценена связь экспрессии генов стволовости в опухоли до лечения и после НАХТ у пациентов с устойчивым и неустойчивым феноменом «замирания». Экспрессия генов SNAI2, MOB3B, BMI1, VIM статистически значимо выше ($p < 0,05$) для больных с неустойчивым феноменом замирания и на уровне тенденции ($p < 0,1$) для генов SMO, KLF4 и LAT также выше у больных с неустойчивым феноменом замирания.

На последнем этапе мы сравнили генетические ландшафты опухоли больных с устойчивым и неустойчивым феноменом «замирания». Было показано, что у всех больных с неустойчивым феноменом замирания есть амплификации генов стволовости и, только у 47% больных с устойчивым «замиранием» гены стволовости амплифицированы. Помимо этого, у больных с неустойчивым «замиранием», по сравнению с группой с устойчивым «замиранием» и амплификацией генов стволовости, с высокой частотой оказываются амплифицированы участки локализации генов WNT-сигналинга (amp5q31.1-34, amp19q13.41), отвечающих за активацию WNT и делетирован регион del12p13.33-12p11.22, в котором локализованы гены WNT, большая часть из которых, отвечает за активацию этого сигнального пути.

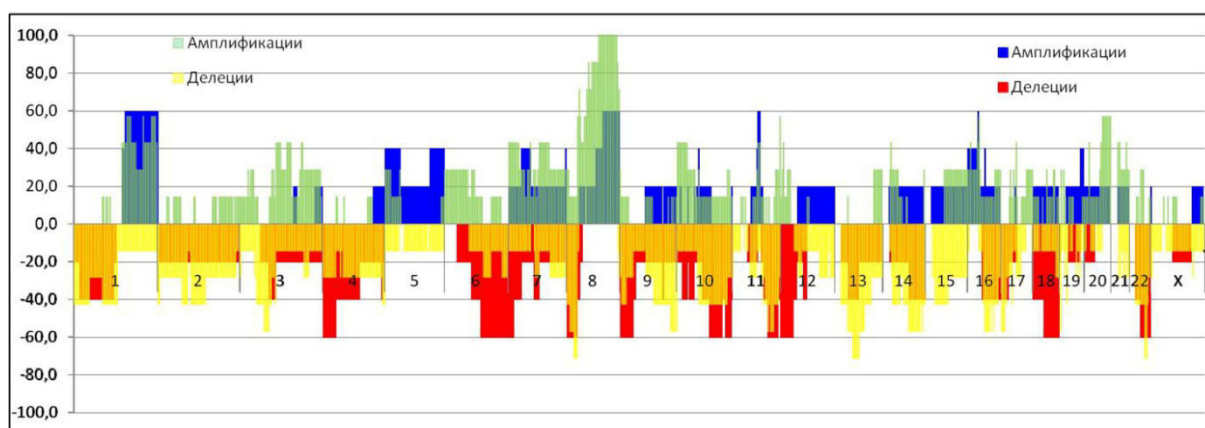


Рис. 2. Сравнение CNA-генетических ландшафтов у больных с устойчивым и неустойчивым феноменом «замирания»

Заключение. Для больных с феноменом «замирания» характерна низкая частота CNA в опухоли. По-видимому, амплификация компонентов WNT-сигналинга и одновременная делеция его ингибиторов, привела пациентов с феноменом «замирания» выход из этого состояния.

Благодарность. Работа поддержана грантом РФФИ 18-29-09131 «Феномен «замирания» опухоли в процессе химиотерапии».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ibragimova M. K., Tsyganov M. M., Litviakov N. V. Natural and chemotherapy-induced clonal evolution of tumors// Biokhimiya.- 2017.- Vol. 82, № 4.- С. 572-586.

**ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
НА ВЫБОРКЕ БОЛЬНЫХ ЗАПАДНО-СИБИРСКОГО РЕГИОНА**

Е.Г. Ефимова¹, А.О. Дегтярева^{1,2}, К.И. Погодаева¹

Научный руководитель: к.м.н., доцент Е.Ю. Леберфарб, к.м.н., доцент А.В. Усова

¹Новосибирский государственный медицинский университет

Россия, г. Новосибирск, Красный проспект 52, 630091

²Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,

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

E-mail: efimefim9@gmail.com

**STUDYING THE CONNECTION OF REGULATORY POLYMORPHISMS WITH BREAST CANCER
IN THE SAMPLE OF PATIENTS OF THE WESTERN SIBERIAN REGION**

E.G. Efimova¹, A.O. Degtyareva^{1,2}, K.I. Pogodayeva¹

Scientific adviser: Ph.D., Leberfarb E.Yu., Ph.D., Usova A.V.

¹Novosibirsk State Medical University, Russia, Novosibirsk city, Krasny Prospekt 52, 630091

²Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of

Sciences, Russia, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva 10, 630090

E-mail: efimefim9@gmail.com

Abstract. *This paper identifies the association of regulatory polymorphisms with the risk of onset of breast cancer. In the study, DNA samples of women with breast cancer were genotyped, as well as women who did not have cancer. A significant association was found between the risk of breast cancer and the rs2072580 polymorphism of the SART3 gene.*

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) – злокачественная опухоль железистой ткани молочной железы. По данным GLOBOCAN (за 2018) РМЖ занимает второе место по частоте встречаемости в мире (11,6%) в структуре онкологической заболеваемости; в России - первое место (13,2%) [1]. Современные подходы молекулярной диагностики дают возможность выявить генетическую предрасположенность к онкологическим заболеваниям, в том числе к РМЖ, что лежит в основе профилактики, которая является основополагающим принципом современной превентивной медицины [2]. Поэтому особенно актуальным является поиск новых маркеров предрасположенности к РМЖ. Такими маркерами могут служить однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) – самый распространенный тип геномных вариаций. Основная задача научных исследований последних лет заключается в определении конкретных функциональных генетических вариантов в регуляторной части генома, которые способны влиять на уровень экспрессии генов (rSNPs) и непосредственно служить причиной развития определенного фенотипа, в том числе онкологического заболевания [3].

В лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦиГ СО РАН г. Новосибирска разработан уникальный подход, основанный на анализе данных полногеномных исследований (ChIPSeq, ChIA-PET, RNA-Seq, GWAS) [4, 5]. С использованием данного подхода был выявлен ряд регуляторных SNP,

связанных с онкологическими процессами, из которых в данное исследование вошли 5 (rs2072580, rs590352, rs3829202, rs11542583, rs4796672).

Цель исследования. Выявить взаимосвязь выбранных регуляторных полиморфизмов с риском развития РМЖ на выборке пациентов Западно-Сибирского региона.

Материалы и методы. По данным полиморфизмам было проведено генотипирование образцов ДНК с использованием аллель-специфичной ПЦР с TaqMan-зондами. Исследуемую группу составили женщины, больные РМЖ (N=131) в возрасте 23-80 лет, контрольная группа состояла из здоровых женщин (N=93) в возрасте 44-69 лет. Ассоциацию между заболеванием и генотипом определяли точным двусторонним критерием Фишера, сравнивая распределение генотипов и аллелей по каждому полиморфизму между группами пациентов и контролей. Связь между генотипами и риском РМЖ анализировалась путем вычисления отношения шансов (odds ratio, OR) и 95% доверительных интервалов (ДИ). Для определения гаплотипов использовали двухэтапный итерационный метод с алгоритмом максимизации ожиданий, реализованный в SNPstats (www.snptest.net).

Результаты. По данным генотипирования были установлены частоты минорных аллелей (МА) для всех полиморфизмов. Для сравнения использовали частоту минорных аллелей SNPs в популяции, представленной в базе данных NCBI в европейской популяции (табл. 1).

Таблица 1

Представленность аллельных вариантов полиморфизмов

rs	Частота МА исследуемой группы (n=131)	Частота МА контрольной группы (n=93)	Частота МА Евр. популяция
2072580 [A<T]	0,561	0,4	0,423
3829202 [C<T]	0,099	0,13	0,119
11542583 [G<A]	0,321	0,25	0,285
590352 [G<C]	0,181	0,24	0,22
4796672 [C<T]	0,348	0,31	0,351

Из всех исследуемых полиморфизмов, частота представленности минорного аллеля rs2072580 повышена в группе больных РМЖ по сравнению с контрольной группой и с данными NCBI.

Распределение частот генотипов и аллелей для rs2072580 T > A представлено в табл.2.

Таблица 2

Частоты генотипов, аллелей полиморфизма rs2072580 T>A и их взаимосвязь с РМЖ

Генотип	Исследуемая группа	Контрольная группа	Тест Фишера p-уровень	Доминантная модель	Кодоминантная модель	Рецессивная модель
T/T	6 (4,6)	36 (38,7)	<0,001	TT/ AT vs AA	AT vs TT/AA	AA vs TT/AT
A/A	22 (16,8)	17 (18,3)		OR (95% ДИ)	OR (95% ДИ)	OR (95% ДИ)
A/T	103 (78,6)	40 (43)		0,08	4,87	0,90
T аллель	115 (43,9)	112 (60,2)	0,001	(0,03 – 0,19)	(2,71 – 8,75)	(0,45 – 1,81)
A аллель	147 (56,1)	74 (39,8)		p =1,0E-10	p<0,001	p =0,77

Для полиморфизма rs2072580 гена *SART3* выявлена взаимосвязь генотипа (p-уровень<0,05) и аллеля (p-уровень<0,01) с развитием РМЖ. В случае остальных полиморфизмов взаимосвязи аллеля и генотипа с заболеванием выявлено не было. Риск развития РМЖ был оценен для различных моделей

наследования (доминантной, кодоминантной и рецессивной). Для rs2072580 показан повышенный риск возникновения РМЖ при генотипе А/Т для кодоминантной модели наследования в общей группе (OR=4,87, p-уровень=<0,001). Для остальных SNPs достоверной связи с РМЖ не выявлено.

Частоты рассчитанных гаплотипов в исследуемой и контрольной группе представлены в табл. 3.

Таблица 3

Частоты гаплотипов, их взаимосвязь с риском РМЖ

	rs2072580	rs3829202	rs11542583	rs590352	rs4796672	Частота(%)	OR(95% ДИ)	p-уровень
1	Т	Т	А	С	Т	19,9	1,00	---
2	А	Т	А	С	Т	13,5	7,88 (1,58- 39,37)	0,013
3	Т	Т	Г	С	Т	8,3	1,16 (0,27 – 5,00)	0,84
4	Т	Т	А	С	С	8,1	2,22 (0,49 – 9,99)	0,3
5	А	Т	А	С	С	7,5	0,77 (0,18 – 3,30)	0,73
6	А	Т	Г	С	Т	6,8	13,84 (2,05 – 93,20)	0,0075

Относительные риски вычислялись по отношению к наиболее часто встречаемому в данной популяции гаплотипу (№1), принятому за 1. Было выявлено 2 гаплотипа (№2, 6), достоверно увеличивающих риск РМЖ. Анализ показал, что первые два гаплотипа отличаются друг от друга единственной заменой (Т/А rs2072580), однако риск развития РМЖ у людей с 2-м гаплотипом выше в 7.8 раз (p-уровень= 0,013). При сравнении гаплотипов №1 и №6 замена также наблюдается в rs11542583 А/Г, при этом риск развития РМЖ у людей с гаплотипом №6 выше в 13,8 раз (p-уровень= 0,0075).

Заключение. На основании полученных результатов мы предполагаем роль полиморфизма rs2072580 гена *SART3* и rs11542583 гена *COG8* в развитии рака молочной железы. В литературе имеются данные о роли этих генов в развитии онкологических заболеваний. В дальнейшем планируется изучить влияние данных полиморфизмов на экспрессию генов, в которых они расположены и их регуляторный потенциал.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. Bray et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *A Cancer Journal for Clinicians*. – 2018. – Vol. 68. – P. 394-424.
2. Немцова М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярно-биологические маркеры в практической онкологии // *Лабораторная служба*. – 2014. – № 1. – С. 14-22.
3. J. Lonsdale et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project // *Nature Genetics*. – 2013. – Vol. 45, № 6. – P. 580-585.
4. E. Korbolina et al. Novel Approach to Functional SNPs Discovery from Genome-Wide Data Reveals Promising Variants for Colon Cancer Risk // *Human Mutation*. – 2018. – Vol. 39. – P. 851-859.
5. Леберфарб Е.Ю., Брызгалов Л.О., Брусенцов И.И., Меркулова Т.И. Выявление новых регуляторных SNP-маркеров, ассоциированных с предрасположенностью к развитию колоректального рака // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2016. – № 20. – С. 34-41.

**РОЛЬ ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА В
ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ**

Е.М. Жидкова, В.П. Максимова, Л.Р. Тилова

Научный руководитель: к.б.н. Е.А. Лесовая

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,

Россия, г. Москва, Каширское шоссе, 24, 115478

E-mail: zhidkova_em@mail.ru

**ROLE OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR SELECTIVE ACTIVATION IN CELL JUNCTION
FUNCTION IN BREAST CANCER CELLS**

E.M. Zhidkova, V.P. Maksimova, L.R. Tilova

Scientific Supervisor: PhD. E.A. Lesovaya

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Russia, Moscow, 24, Kashirskoe shosse, 115478

E-mail: zhidkova_em@mail.ru

Abstract. *Glucocorticoids (GC) are used as an adjuvant in breast cancer (BC) therapy. However, they develop numerous side effects including the destruction of cell-cell junctions, promotion of tumor cell migration and metastasis formation. Biological response to GCs is mediated by glucocorticoid receptor (GR) regulating gene expression via transactivation, direct GR binding with its responsive elements on DNA, associated with side effects of GC, and transrepression, negative interaction between GR and transcription factors. We have previously demonstrated that Compound A, a selective GR agonist (SEGRA), has a GR-dependent antitumor effect on BC cell lines. In this study we focused on research of the influence of GC and SEGRA on intercellular junctions and gene expression profile associated with migration and metastasis of BC. We have shown that SEGRA, in contrast with GC, did not impair cell junction. At molecular level, GC and SEGRA have different and depending on the molecular subtype of cells effects on the expression of marker genes.*

Введение. В протоколах комбинированной терапии рака молочной железы (РМЖ) в качестве адьювантов для уменьшения побочных эффектов цитотоксических препаратов и расширения их терапевтического интервала используются синтетические глюкокортикоиды (GC), которые обладают противовоспалительным, противорвотным и иммуносупрессивным действием. Биологическое действие GC реализуется посредством их взаимодействия с находящимся в цитоплазме клетки глюкокортикоидным рецептором (GR). Активированный GR транслоцируется в ядро, реализуя свои биологические эффекты по механизму транс-активации (ТА) или транс-репрессии (ТР). Терапевтический эффект GC в основном реализуется посредством ТР, представляющей собой белок-белковое взаимодействие GR с факторами транскрипции [1], в результате чего ингибируется экспрессия ряда про-пролиферативных генов. Побочные эффекты GC опосредованы запуском ТА – связывания димера GR с респонсивными элементами в промоторных областях генов, регулирующих пролиферацию и инвазивный потенциал клетки.

В настоящее время исследования направлены на поиск и разработку путей селективной активации GR, заключающейся в индукции механизма TP без запуска TA. Наиболее перспективными среди лигандов GR являются селективные агонисты GR (SEGRA). При связывании GR с SEGRA комплекс «лиганд-рецептор» не способен к димеризации, а, следовательно, и к связыванию с GRE и к запуску TA. TP при этом реализуется в полном объеме. Один из представителей таких соединений – Compound A (CpdA, 2-(4-ацетоксифенил)-2-хлор-N-метилэтиламмоний хлорид), противоопухолевый эффект которого был изучен нами и другими исследователями на моделях гемобластозов и рака предстательной железы *in vitro* и *in vivo* [2]. Также ранее нами был показан GR-зависимый антипролиферативный эффект CpdA на клетки рака молочной железы [3]. Помимо этого, благодаря способности избирательно запускать TP данное соединение может служить инструментом для изучения фундаментальных механизмов действия GR.

Важной проблемой, существующей в современной GC-терапии, является неоднозначность эффектов GC при применении в лечении разных типов опухолей. Биологические эффекты GC реализуются более выражено в гормон-зависимых опухолях, включая РМЖ. Однако, за счет гетерогенности РМЖ в отношении гормонального статуса опухоли, эффекты GC при применении в лечении разных типов РМЖ крайне неоднозначны. Так, активация GR может подавлять эстроген-зависимую пролиферацию клеток [4] и увеличивать продолжительность жизни пациентов [5]. В то же время в клетках РМЖ без эстрогенового рецептора активация GR ассоциирована с стимуляцией метастазирования неблагоприятным прогнозом [6].

Целью данного исследования являлось изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе различия влияния лигандов GR на клетки РМЖ различных молекулярных РМЖ.

Экспериментальная часть. В работе использовались культуры клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453. Целостность щелевых контактов оценивали по степени миграции красителя Lucifer Yellow от царапины в монослой неповрежденных клеток; качестве положительного контроля был использован TPA (12-O-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат). Экспрессию маркерных генов (*MKP1*, *ICAM1*, *FIBL1*, *cJUN*, *KLF4*, *IL6*, *IL8*, *CSF-1*, *Rhob*, *SK-1*, *MMP9*, *ANXA1*, *COL1A1*) оценивали методом количественной полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Результаты. Утрата клетками адгезионных молекул и межклеточных контактов – одна из стадий процесса метастазирования опухоли. Полученные данные (рис. 1А) свидетельствуют о том, что GC разобщают межклеточные контакты клеток РМЖ, в то время как CpdA не влияет на их целостность. Влияние Dex и CpdA на экспрессию маркерных генов, для которых известна как роль в метастазировании РМЖ, так и участие в реализации сигнального пути GR (рис. 1Б), неоднозначно и сильно варьируется в зависимости от гормонального статуса клеток.

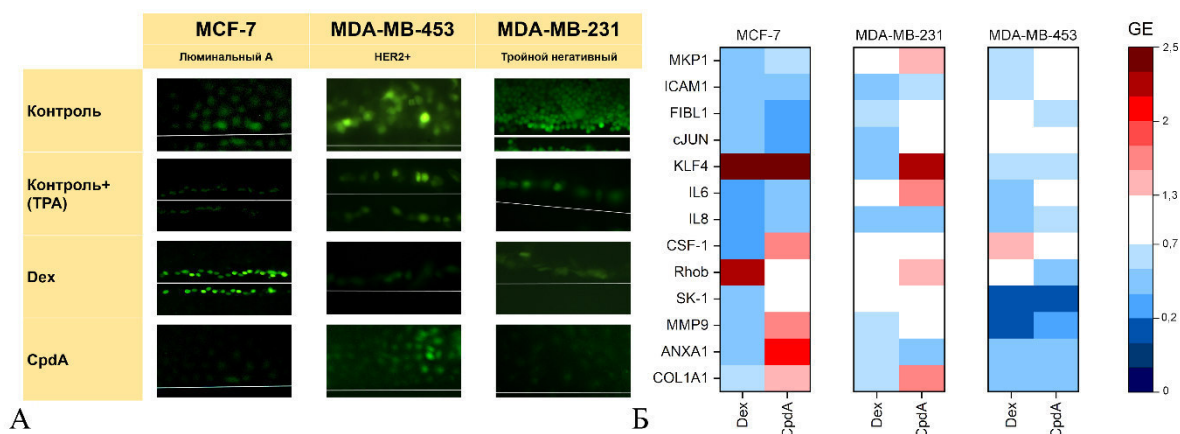


Рис 1. А) Влияние Dex и Cpda на межклеточные контакты. Клетки культивировали с Dex/Cpda (10 мкМ) в течение 24 ч, в качестве положительного контроля – клетки, обработанные 5 мкг/мл TPA. Б) Действие Dex/Cpda на экспрессию маркерных генов. Клетки культивировали с Dex/Cpda (10 мкМ) в течение 24 ч. Уровень экспрессии гена оценивали методом ОТ-ПЦР, результаты нормализованы относительно экспрессии гена Rpl27

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, Cpda, в отличие от GC не влияет на целостность межклеточных контактов. При этом влияние GC и SEGRA на экспрессию маркерных генов сильно варьируется в зависимости от молекулярного подтипа клеток РМЖ. Полученные результаты подтверждают целесообразность исследований SEGRA как адьювантов для терапии РМЖ. Cpda является перспективным инструментом специфического воздействия на определенную когорту компонентов сигнальных путей, связанных с развитием метастаз РМЖ.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 17-75-20124.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ramamoorthy, S., Cidlowski, J. A. (2013). Exploring the Molecular Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action from Sensitivity to Resistance. *Endocr. DeVol*, no. 24. pp. 41–56.
2. Yemelyanov, A., Czornog, J., Gera L. et al. (2008). Novel steroid receptor phyto-modulator Compound A inhibits growth and survival of prostate cancer cells. *Cancer Research*, no.68. pp. 4763-4773.
3. Жидкова Е.М., Кузин К.А., Тилова Л.Р., Савинкова А.В., Борисова О.И., Лаврова М.Д., Максимова В.П., Кирсанов К.И., Якубовская М.Г., Лесовая Е.А. Сравнительный анализ биологических эффектов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора CPDA на клеточные линии рака молочной железы различных молекулярных подтипов // *Сибирский онкологический журнал*. – 2017. – Т. 6., № 16 – С. 41–46.
4. Karmakar, S., Jin Y., Nagaich, A.K. (2013). Interaction of glucocorticoid receptor (GR) with estrogen receptor (ER) alpha and activator protein 1 (AP1) in dexamethasone-mediated interference of ERalpha activity. *The Journal of biological chemistry*, no. 288. pp. 24020-24034.
5. Keith B.D. (2008). Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. *BMC cancer*, no. 8. pp. 84-90.
6. Pan D., Kocherginsky M., Conzen S.D. (2011) Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Research*, vol.71, no 20. pp. 6360-6370.

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ ЭКЗОСОМ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ РАКЕ

Е.А. Замбалова, А.А. Димча

Научный руководитель: д.м.н. Н.В. Юнусова

НИИ онкологии, Томский НИМЦ,

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

E-mail: etugutova@mail.ru

EXOSOMAL MATRIX METALLOPROTEINASES IN COLORECTAL CANCER

E.A. Zambalova, A.A. Dimcha

Scientific Supervisor: Dr. N.V. Yunusova

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kooperativni str., 5, 634009

E-mail: etugutova@mail.ru

Abstract. *Exosomal MMP9/MMP2/EMMPRIN subpopulations were studied using flow cytometry. Exosomes were isolated in patients with colorectal cancer and in control patients. The level of MMP9-positive exosomes was significantly higher in patients with colorectal cancer compared with control patients. The proportion of MMP9-negative and triple positive MMP9+/MMP2+/EMMPRIN+ exosomes, on the contrary, was higher in control patients compared with patients with colorectal cancer. Mixed subpopulation of MMP9+/MMP2-/EMMPRIN- exosomes prevailed both in patients with colorectal cancer and in control patients. There were no significant differences in the subpopulations of MMP and EMMPRIN in the exosomes of colorectal cancer patients depending on the age, stage, grade and localization. Further studies are needed to study the exosomal subpopulations and the possibility of their use as diagnostic biomarkers.*

Введение. Колоректальный рак является одним из наиболее распространенных видов опухолей желудочно-кишечного тракта и занимает 3 место по заболеваемости и 2 место по смертности в структуре онкологических заболеваний в большинстве стран мира, как у мужчин, так и у женщин. В настоящее время большое значение в процессах инвазии и метастазирования опухолей придается внеклеточным везикулам, в частности экзосомам (везикулам размером 30-100 нм), которые участвуют в передаче сигналов, ремоделировании стромы, индукции ангиогенеза, в канцерогенезе, метастазировании и химиорезистентности [1, 2]. Около 32% белкового состава экзосом составляют протеазы. Выделяют тетраспанин-ассоциированные, тетраспанин-неассоциированные протеазы, а также протеазы с неизвестной локализацией в экзосомах [3]. В процессах опухолевой инвазии и метастазирования наибольшее значение отводят тетраспанин-ассоциированным протеазам, к которым относят матриксные металлопротеиназы (ММП) - семейство секретруемых или мембрано-ассоциированных цинк-зависимых протеаз.

Целью исследования являлась оценка экспрессии матриксных металлопротеиназ ММП9, ММП2 а также их индуктора ЕММРІN в экзосомах плазмы крови больных колоректальным раком для поиска перспективных экзосомальных маркеров, связанных с инвазией и метастазированием.

Материалы и методы. В исследование включены 50 больных колоректальным раком с различными стадиями (T2-4N0-2M0-1) и 10 контрольных пациентов. Критериями включения пациентов в

исследование явились: согласие пациента на участие в исследовании, колоректальный рак T2-4N0-2M0-1. Критериями исключения явились: первично-множественные формы колоректального рака, колоректальный рак Ia стадии (T1N0M0), рак прямой кишки с поражением средне- и нижнеампулярного отдела. Материалом для исследования послужили образцы КЗЭДТА-плазмы крови. Экзосомы из плазмы крови были выделены методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием [4]. Образцы выделенных экзосом были охарактеризованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и проточной цитометрии [5]. Уровень матриксных металлопротеиназ ММП9, ММП2, а также их индуктора EMMPRIN оценивали с помощью проточной цитометрии.

Результаты. Общество по изучению внеклеточных везикул рекомендует характеризовать выделенные везикулы методом электронной микроскопии в сочетании с иммуноокрашиванием антителами CD63, CD9 или CD81. Принадлежность выделенных везикул к классу экзосом была подтверждена методом трансмиссионной электронной микроскопии. В препаратах экзосом, выделенных из плазмы крови контрольных пациентов и больных колоректальным раком, обнаружены четко структурированные частицы чашеобразной формы низкой электронной плотности с сохранной мембраной. Выявлено, что их морфология не отличается от экзосом больных с другими злокачественными новообразованиями. В препаратах также присутствовали частицы, называемые «не-везикулами», которые представляют собой липопротеины низкой или очень низкой плотности.

Выделенные экзосомы также были охарактеризованы методом проточной цитометрии на наличие экзосомальных маркеров (CD24, CD9, CD81 и CD63). Сочетание конъюгированных и неконъюгированных антител позволяет идентифицировать различные субпопуляции экзосом [6]. По снижению медианы интенсивности флуоресценции (MFI) субпопуляции экзосом распределялись следующим образом: CD24/CD9>CD9/CD81>CD24/CD63>CD9/CD63 (экзосомы плазмы крови контрольных пациентов); CD9/CD81>CD9/CD63>CD24/CD9>CD24/CD63 (экзосомы плазмы крови больных колоректальным раком). Таким образом, субпопуляционный состав экзосом из плазмы крови контрольных пациентов и больных колоректальным раком различен.

Для анализа субпопуляций ММП9/ММП2/EMMPRIN в экзосомах плазмы крови была выполнена проточная цитометрия с использованием альдегид-сульфатных латексных частиц, покрытых антителами к CD9. Так как в экзосомах больных колоректальным раком и контрольных пациентов наиболее часто встречаются ММП9-позитивные экзосомы, акцент в работе сделан на изучение этой субпопуляции. Выявлено, что уровень ММП9-позитивных экзосом был значимо выше у больных колоректальным раком по сравнению с контрольными пациентами. Доля ММП9-негативных и трипл-позитивных ММП9+/ММП2+/EMMPRIN+ экзосом, наоборот, была выше у контрольных пациентов. Субпопуляция ММП9+/ММП2-/EMMPRIN- экзосом доминировала как у больных колоректальным раком, так и у контрольных пациентов (до 73%). Выявлены гендерные различия во встречаемости ММП9+/ММП2+/EMMPRIN+ субпопуляции экзосом у больных колоректальным раком: у женщин данная субпопуляция встречалась чаще, чем у мужчин, в $0,38 \pm 0,06$ и $0,20 \pm 0,05$ процентах, соответственно, $p < 0,05$. Вообще, ММП9-позитивные экзосомы у больных колоректальным раком также несколько чаще встречались у женщин, однако различия были недостоверными. Не выявлено значимых различий в субпопуляциях ММП и EMMPRIN в экзосомах плазмы крови больных колоректальным

раком в зависимости от возраста, стадии, степени дифференцировки и локализации опухолевого процесса.

Выводы. Экспрессия ММП и EMMPRIN в экзосомах при колоректальном раке не зависела от стадии заболевания, поэтому маловероятно, что эти биомаркеры в экзосомах могут использоваться в качестве прогностических циркулирующих маркеров, полезных для оптимизации адъювантного лечения. Однако уровни ММП9-позитивных, ММП9-негативных и ММП9+/ММП2+/EMMPRIN+ экзосом у контрольных пациентов и больных колоректальным раком статистически значимо различались. Необходимы дальнейшие исследования по изучению субпопуляционного состава экзосом у больных колоректальным раком и возможности их использования в качестве диагностических маркеров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Томской области в рамках научного проекта №18-415-703006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li W., Li C., Zhou T. (2017). Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Mol Cancer*, V. 16, no. 1, pp. 145.
2. Юнусова Н.В., Тамкович С.Н., Кондакова И.В. Экзосомы в различных биологических жидкостях: состав и функции // Молекулярная медицина. – 2017. - Т. 15. - № 4. – С. 14-22.
3. Yunusova N.V., Tugutova E.A., Tamkovich S.N., Kondakova I.V. (2018). The role of exosomal tetraspanins and proteases in tumor progression. *Biochemistry. Supplement series B: Biomedical chemistry*, V. 12, no. 3, pp. 191-202.
4. Tamkovich, S.N., Yunusova, N.V., Stakheeva, M.N., Somov, A.K., Frolova, A.Y., Kirushina, N.A., Afanasyev, S.G., Grigoryeva, A.E., Laktionov, P.P., Kondakova, I.V. (2017). Isolation and characterization of exosomes from blood plasma of breast cancer and colorectal cancer patients. *Biochemistry. Suppl. Series B: Biomedical Chemistry*, V. 11, no. 3, pp. 291-295.
5. Yunusova, N.V., Tamkovich, S.N., Stakheeva, M.N., Grigor'eva, A.A., Somov, A.K., Tugutova, E.A., Kolomiets, L.A., Molchanov, S.V., Afanas'ev, S.G., Kakurina, G.V., Choinzonov, E.L., Kondakova, I.V. (2017, September). The characterization of exosomes from biological fluids of patients with different types of cancer, V. 1882, Issue 1. Retrived October 10, 2017, from <http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.5001659>
6. Замбалова Е.А., Патышева М.Р., Димча А.А., Тамкович С.Н., Григорьева А.Е., Колегова Е.С., Кондакова И.В., Афанасьев С.Г., Юнусова Н.В. Экзосомальные протеазы при колоректальном раке // Успехи молекулярной онкологии. – 2018. –Т. 5. - №4. – С.117–126.

**ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ В ПРОГРЕССИИ
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

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

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

Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,

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

Национальный исследовательский томский государственный университет,

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

E-mail: imk1805@yandex.ru

MEANING STEMNESS GENE EXPRESSION IN THE PROGRESSION OF BREAST CANCER

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

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

Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Russia, Tomsk, Kooperativny str. 5, 634050

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

E-mail: imk1805@yandex.ru

Abstract. *In a study of a mammary gland tumor in 62 patients before treatment and after neoadjuvant chemotherapy, overexpression of a residual tumor in 14 of 16 stemness genes in patients with subsequently developed metastases was shown. It was shown that with overexpression of three of the studied OCT3, LAT and LMNB2 genes in residual residual tumor in 69% of patients, hematogenous metastases were detected. With hypoeexpression of at least one of these genes, the 5-year non-metastatic survival rate is 94% (34/36). A model was obtained for predicting the occurrence of hematogenous metastasis based on the analysis of the expression of 16 stemness genes. In studying the significance of stem gene amplifications for the activity of tumor stem cells, it was shown that patient's epithelial non-stem tumor cells with stem stem amplifications express stem stem genes at the level of tumor stem cells and are capable of forming tumor stem cells.*

Введение. Согласно результатам предыдущих исследований, было показано, что при проведении неоадьювантной химиотерапии (НХТ) под влиянием химиопрепаратов происходит клональная эволюция опухоли, при которой происходит изменение опухолевых клонов – полное/частичное исчезновение или появление новых. Новые клоны содержат амплификации в следующих локусах: 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 19p, 18 chr. Выявлено, что появление в резидуальной опухоли в процессе НХТ любых 2 и более амплификаций этих регионов, приводит к 100% гематогенному метастазированию, у всех остальных больных с элиминацией ОК или появлением делеционных клонов не было метастазов в 5-ти летний период наблюдения ($p=0,00001$) [1]. На основании этих и литературных данных [2] нами была высказана рабочая гипотеза о том, что клоны, несущие амплификации в вышеуказанных локусах являются потенциальными метастатическими клонами. Возможно, в процессе клональной эволюции опухоли соматическими опухолевыми клетками, благодаря гиперэкспрессии генов приобретает способность к обратному переходу в опухолевые стволовые клетки – осуществление стволового перехода. Предполагается, что только такие опухолевые клетки могут образовывать метастазы.

Целью настоящего исследования явилась оценка эффективности НХТ и безметастатической выживаемости больных раком молочной железы (РМЖ) на основе изучения наличия амплификационных клонов в первичной опухоли больных и оценке экспрессии генов стволовости.

Материал и методы. В исследование включены 62 больных с диагнозом РМЖ IIА – IIIВ (Т1-4N0-3M0), средний возраст $47,4 \pm 0,8$ лет. Материалом служили образцы биопсийного материала до лечения. Была выделена ДНК и РНК при помощи наборов QIAamp DNA mini Kit и RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany), соответственно. Наличие амплификаций определялось с использованием микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, USA). Экспрессию генов стволовости оценивали при помощи метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan и с использованием экспрессионного микроматричного анализа на платформе GeneChip (Affymetrix, USA).

Результаты. У больных без метастазов до лечения гиперэкспрессированы 5 генов - *OCT3*; *BM11*; *LMNB2*; *TGFb1* и *FLT3*; у больных с метастазами до лечения гиперэкспрессированы 7 генов – *OCT3*; *BM11*; *LMNB2*; *TGFb1*; *TERT*; *SNAI2*; *TGFbR1*. После проведения НХТ в резидуальной опухоли больных без метастазов частота гиперэкспрессированных генов не меняется. У больных с метастазами после НХТ в резидуальной опухоли гиперэкспрессированы 14 из 16 генов – кроме *KLF1*, *SMAD2*. При этом, при гиперэкспрессии в резидуальной опухоли трех генов *OCT3*, *LAT*, *LMNB2* у 69% больных (11/16) зарегистрировано возникновение гематогенных метастазов. При гипозэкспрессии хотя бы одного из этих генов 5-ти летняя безметастатическая выживаемость составляет 94% (34/36) (рис. 1).

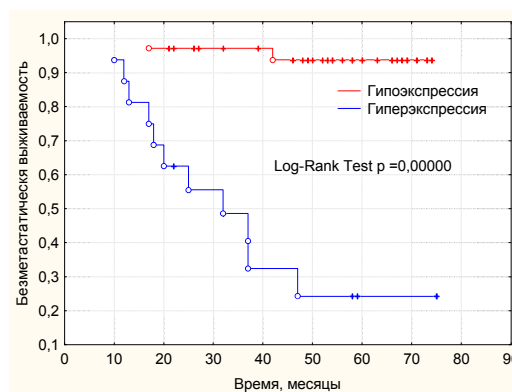


Рис. 1. Безметастатическая выживаемость больных РМЖ при гипо- и гиперэкспрессии генов *OCT3*, *LAT* и *LMNB2* (Log-Rank Test $p = 0,00000$)

Следующим этапом работы было изучение значения амплификаций генов стволовости для активности опухолевых стволовых клеток. Исследовали экспрессию генов стволовости в ЕрСам+ клетках, полученных из опухоли молочной железы больной St с амплификациями генов стволовости 3q, 6q, 8q, 9q, 10q22.1 (amp *SOX2*, *MYC*, *KLF4*, *NOTCH1*, *NODAL*) и больной Тi без амплификаций генов стволовости. Повышенный уровень экспрессии 10/16 изученных генов стволовости (*SOX2*, *OCT3*, *MYC*, *TGFBR1*, *KLF4*, *TGFBI*, *LAT*, *SMAD2*, *LNMB2*, *VIM*) наблюдался и в ЕрСам+ опухолевых клеток, выделенных из опухоли пациентки St по сравнению с ЕрСам+ опухолевыми клетками от пациентки Тi. В специализированной среде Human EpiCult-C после обработки субпопуляций опухолевых клеток ИЛ-6 количество клеток после 3 пассажа не увеличилось в популяции ЕрСам+ клеток, полученных из опухоли

молочной железы больной T1, однако, прирост EpCam+ клеток опухоли молочной железы больной St был иным - увеличение клеточной массы более чем в 3 раза наблюдалось уже после первого пассажа, после третьего пассажа наблюдался резкий прирост массы клеток более чем в 300 раз. Заключительным этапом работы была оценка активности опухолевых стволовых клеток *in vitro* - образование первичных маммосфер в культуре в среде MammoCult. Так, не наблюдалось образование маммосфер из популяции EpCam+ клеток от больной T1. Добавление ИЛ-6 в культуру EpCam+ клеток третьего пассажа от больной T1 также не вызывало образование маммосфер, наблюдалось увеличение клеточной массы в 2,5 раза. При этом колониеобразование из EpCam+ клеток третьего пассажа от больной St не наблюдалось. Через 10 суток после добавления ИЛ-6 были выявлены маммосферы (рис. 2).

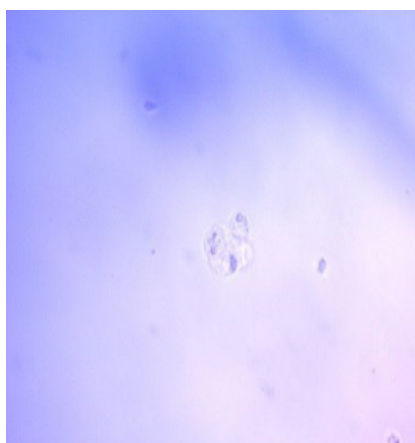


Рис. 2. Маммосферы в EpCam⁺CD44⁻ культуре, полученной из опухоли молочной железы больной St.

Заключение. У больных с развившимися впоследствии метастазами после проведения НХТ количество гиперэкспрессированных генов стволовости увеличилось в два раза. Это свидетельствует о важной роли активации экспрессии генов стволовости для метастазирования опухолей. На основе анализа экспрессии генов стволовости *OCT3*, *LAT* и *LMNB2* в резидуальной опухоли разработан новый прогностический фактор с диагностической точностью 82%. Эпителиальные нестволовые опухолевые клетки больной с амплификациями генов стволовости экспрессируют гены стволовости на уровне опухолевых стволовых клеток и способны образовывать опухолевые стволовые клетки.

Благодарность. Работа поддержана грантом РФФИ 17-15-01203.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Литвяков Н.В. Естественная и химио-индуцированная клональная эволюция опухоли // Биохимия. – 2017. – Т. 82. – № 4. – С. 572-586.
2. Weinberger L., Ayyash M., Novershtern N., Hanna J.H. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2016. – V. 17. – P. 155–169.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ
ИЗ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ U251**

Н.А. Перекуча^{1,2}, М.В. Гридина², О.П. Иккерт^{1,3}

¹Сибирский государственный медицинский университет,

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

²Томский политехнический университет,

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

³Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

E-mail: olia.ikkert@yandex.ru

**DETERMINATION OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM
PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE ON THE CELLULAR U251 LINE**

N.A. Perekucha^{1,2}, M.V. Gridina², O.P. Ikkert^{1,3}

¹Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow highway, 2, 634050

²National Research Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050

³Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: olia.ikkert@yandex.ru

Abstract. *In the present study, the cytotoxicity of microbial communities and pure cultures of bacteria obtained by the method of cultivation from patients with Parkinson's disease was analyzed in a human U251 glioma cell line. Co-cultivation of the U251 cell line was carried out for four and eight hours with accumulative bacterial cultures and pure cultures of Clostridium symbiosum, obtained from the microbiota of patients with Parkinson's disease, and Escherichia coli, a collection strain XL-blue. The cytotoxicity of microorganisms belonging to the genus of Clostridium, Ruminococcus and Eggerthella, particularly to the Ruminococcus gnavus, Clostridium celatum, Eggerthella lenta and Clostridium symbiosum, was shown during co-cultivation with the cell line. A cytotoxic effect was also shown through the co-cultivated with the pure Clostridium symbiosum culture.*

Введение. Нейродегенеративные заболевания являются наиболее изучаемые, но эффективного лечения таких заболеваний, как болезни Альцгеймера или Паркинсона, не существует. Современные исследования раскрывают их многогранный характер, который требует сложного и разнонаправленного подхода к лечению. В одном из подходов наиболее важной задачей является понимание роли микробиоты кишечника при нейродегенеративных заболеваниях, в том числе болезни Паркинсона. Кроме того микрофлора кишечника может выступать как биомаркером развития нейродегенеративного заболевания, например болезни Паркинсона [1-3]. Так, например, при пересадке кишечной микробиоты от пациента с болезнью Паркинсона мышам, было показано развитие симптомов, похожих на проявление заболевания у этих мышей: моторного дефицита, активации микроглии и запуск агрегации альфа-синуклеина [4]. Микробиота кишечника может влиять как на запуск агрегации альфа-синуклеина, так и на гибель клеток нервной системы, приводящих к нарушениям когнитивным и двигательным расстройствам.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение цитотоксического эффекта микробных сообществ и чистой культурой *Clostridium symbiosum*, полученных из микробиоты кишечника пациентов с болезнью Паркинсона, при сокультивировании с модельной клеточной линии глиомы человека U251.

Экспериментальная часть. Для получения накопительных культур пробы фекалий, пациентов с болезнью Паркинсона, помещали в раствор Рингера и дополнительно вносили 1% дрожжевой экстракт и субстраты: 1% триптон (2.22), 1% пептон, 1% сахара (2.23), 1% крахмал (2.32). Чистая культура *Clostridium symbiosum* была выделена ранее из микробиома кишечника пациентов с болезнью Паркинсона. В качестве контроля использовали лабораторный штамм *Escherichia coli XI blue*. Таксономическую принадлежность микроорганизмов в накопительных культурах определяли методом ампликонного секвенирования на приборе MiSeq (Illumina) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 в режиме 2*150 согласно рекомендациям производителя. Обработка результатов секвенирования выполняли с использованием QIIME2 под операционной системой Linux [4, 5].

Сокультивирование клеточной линии с накопительными и чистыми культурами проводили в течении 4 и 8 часов в среде на основе DMEM/F12 (влажность, 5% CO₂, 37°C). Клетки рассаживали в 24-луночный планшет в количестве 5*10⁵ на одну лунку, при этом на одну клетку глиомы приходилось 10 клеток микроорганизмов. Количество микроорганизмов при сокультивировании определяли с помощью микроскопии. Цитотоксичность микробных сообществ измеряли на проточном цитофлуориметре по первому каналу (BD Accuri C6, США). Анализ жизнеспособности клеток U251 осуществляли с помощью красителя Sytox™ Green (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты. В данной работе были получены накопительные культуры №№ 2.22, 2.23, 2.32, и определено таксономическое положение микроорганизмов в них, рода преобладающие в накопительных культурах представлены в таблице 1. При сокультивировании клеточной линии U251 с накопительными и чистыми культурами в течение четырех часов процент гибели клеток практически не отличался от контроля и составлял 10,65% в контроле с *E.Coli*, 10,41% – с *Clostridium symbiosum*, 6,15% – с 2.22, 9,59% – с 2.23, и 4,48% – с 2,32. При более длительном культивировании, в течении восьми часов наблюдали резкое увеличение процента гибели клеток при сокультивировании с накопительной культурой 2.22, содержащей преимущественно *Ruminococcus*, *Eggerthella* и *Clostridium*, и чистой культурой *Clostridium symbiosum*, 25,42% и 32,32%, соответственно. С накопительными культурами 2.23 и 2.32, содержащими преимущественно *Oscillospira*, *Tissierella/Soehngenia*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, наблюдали незначительный, но обратный эффект относительно контроля, так процент гибели клеток составлял 13,91% и 12,76%, соответственно, а в контроле – 15,23% (рисунок 1).

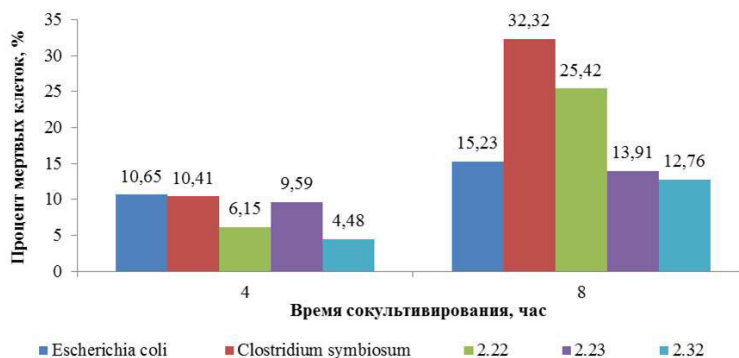


Рис. 1. Процент гибели клеток U251 при сокультивировании с бактериальными культурами

Таблица 1

Процентное соотношение родовой (видовой) принадлежности микроорганизмов, преобладающих в микробном сообществе накопительных культур 2.23, 2.32, 2.22

Рода (виды) бактерий	2.23	2.32	2.22
<i>Lactobacillus (Lactobacillus mucosae)</i>	33,78% (33,76%)	0,49%	≥ 0,01%
<i>Enterococcus</i>	9,56%	0,34%	≥ 0,01%
<i>Bifidobacterium</i>	9,16%	1,38%	0,46%
<i>Oscillospira</i>	3,33%	20,47%	5,94%
<i>Clostridium (Clostridium symbiosum)</i>	0,09% (≥ 0,01%)	2,86% (≥ 0,01%)	30,33% (30,32%)
<i>Ruminococcus (Ruminococcus gnavus)</i>	0,12% (0,03)	0,18% (0,04%)	14,05% (14,05%)
<i>Eggerthella (Eggerthella lenta)</i>	≥ 0,01%	0,9% (0,90%)	23,78% (23,78%)
<i>Tissierella/Soehngenia</i>	≥ 0,01%	19,46%	≥ 0,01%

Заключение. В результате проведенных исследований была показана цитотоксичность микроорганизмов принадлежащих к родам *Clostridium*, *Ruminococcus* и *Eggerthella*, в частности *Ruminococcus gnavus*, *Eggerthella lenta* и *Clostridium symbiosum*, преобладающие у пациентов с болезнью Паркинсона. Преобладание данных микроорганизмов в микробиоте кишечника вероятно может быть одним из факторов вызывающих гибель нейронов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-415-703004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype // *Mov Disord.* – 2015. – 30(3):350-8.
2. Keshavarzian A., Green S.J., Engen P.A., Voigt R.M., Naqib A., Forsyth C.B., Mutlu E., Shannon K.M. // Colonic bacterial composition in Parkinson's disease // *Mov Disord.* – 2015. – 30 (10):1351-60.
3. Петров В.А., Алифирова В.М., Салтыкова И.В., Жукова И.А., Жукова Н.Г., Дорофеева Ю.Б., Тяхт А.В., Алтухов И.А., Кострюкова Е.С., Титова М.А., Миронова Ю.С., Ижболдина О.П., Никитина М.А., Перевозчикова Т.В., Файт Е.А., Сазонов А.Э. Сравнительный анализ кишечной микробиоты при болезни Паркинсона и других неврологических заболеваниях // *Бюллетень сибирской медицины.* 2016. – Т. 15., № 5. – С. 113-125.
4. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schretter CE, Rocha S, Gradinaru V, Chesselet MF, Keshavarzian A, Shannon KM, Krajmalnik-Brown R, Wittung-Stafshede P, Knight R, Mazmanian SK. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease // *Cell.* – 2016. – 1;167(6):1469-1480.e12.
5. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucl. Acids Res.* – 201341 (D1): D590-D596.

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У РАБОТНИКОВ
СИБИРСКОГО ХИМИЧЕСКОГО КОМБИНАТА, ПОДВЕРГАВШИХСЯ РАДИАЦИОННОМУ
ВОЗДЕЙСТВИЮ (СРАВНЕНИЕ ДАННЫХ 2014 И 2019 ГОДОВ)**

Д.С. Исубакова^{1,2}, М.В. Халюзова¹, Е.В. Брониковская¹

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

¹Северский биофизический научный центр ФМБА России

Россия, Томская обл., ЗАТО Северск, г. Северск, пр. Коммунистический, 87, 636039

²НИИ онкологии Томского НИМЦ

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

E-mail: isubakova.daria@yandex.ru

**CYTOGENETIC ABNORMALITIES IN LYMPHOCYTES IN WORKERS OF THE SIBERIAN
GROUP OF CHEMICAL ENTERPRISES EXPOSED TO RADIATION
(2014 AND 2019 COMPARISON)**

D.S. Isubakova^{1,2}, M.V. Khalyuzova¹, E.V. Bronikovskaya¹

Scientific Supervisor: Dr. N.V. Litvyakov

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

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

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

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

E-mail: isubakova.daria@yandex.ru

Abstract. *The main aim of this study was to analyze the data on the frequency and spectrum of cytogenetic abnormalities in the cohort of Siberian Group of Chemical Enterprises (SGCE) employees, considering their age and sex, type of radiation and external irradiation dose. Study was conducted on the samples obtained from 1,308 SGCE employees exposed to external radiation. We have found that the dose dependence of quantity for aberrant cells, chromosomal aberrations, dicentric and paired fragments, chromatid exchanges and chromatid fragments is non-linear. There has been observed phenomenon of hormesis for aberrant cells and chromosome type aberrations in dose range 0–10 mSv; for paired fragments, hormesis is noted in the range of up to 40 mSv. For chromatid fragments, the phenomenon of radiation hormesis, established earlier, was not confirmed in the present study, and, at all, is not observed for dicentric chromosomes. The threshold level of the chromosomal aberrations frequency increase depends on their type and are implement in the dose range of 10–200 mSv. The plateau is noted in the range of 100–800 mSv. The frequency increases in direct proportion to the dose of external exposure: for dicentric after 500 mSv and for other types of chromosomal aberrations after 800 mSv.*

Введение. Проведено сравнение полученных в исследованиях 2019 г. данных показателей частоты и спектра цитогенетических аномалий у работников Сибирского химического комбината (СХК), в процессе профессиональной деятельности подвергавшихся хроническому радиационному облучению, с данными, полученными в 2014 г. [1]. Целью работы явилось сравнение частоты и спектра нестабильных

хромосомных аномалий (ХА) у 1 308 здоровых работников СХК, подвергавшихся хроническому радиационному воздействию, с данными полученными в 2014 г.

Экспериментальная часть. В 2019 г. в исследуемую группу вошли 1 308 работников СХК, которые подвергались хроническому воздействию внешнего (γ -излучение), внутреннего (за счёт инкорпорированного ^{239}Pu) или сочетанного (внешнего и внутреннего) облучения в процессе профессиональной деятельности (в работе 2014 г. было 657 обследованных). Контрольную группу составили 100 работников СХК, не подвергавшихся радиационному воздействию. Для всех обследованных лиц был проведён стандартный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови.

Результаты. В исследовании 2014 г. частота ХА не коррелировала с возрастом, однако в 2019 г. была обнаружена слабая корреляция с возрастом для aberrаций хромосомного типа, колец, дицентриков и полиплоидов (r колебался от 0,09 до 0,19), что соответствует литературным данным [2]. Частота ХА не коррелировала с гендерной принадлежностью работников СХК, как и в исследовании 2014 г. Повторные исследования частоты индукции ХА в зависимости от вида радиационного воздействия в целом подтверждают факт, что для индукции ХА определяющим фактором является хроническое внешнее облучение. Было показано, что дозовая зависимость имеет нелинейный S-образный характер для aberrантных клеток (рис. 1.), дицентриков (рис. 2.), aberrаций хромосомного типа (рис. 3.), парных фрагментов, хроматидных обменов и хроматидных фрагментов. На рис. 1-3 указаны 2 уровня значимости статистических различий: p^* – уровень статистической значимости различий с контролем; p_{1-7} – уровень статистической значимости различий с предыдущей точкой. Как и в 2014 г., в настоящем исследовании при облучении в дозе $> 0-10$ мЗв наблюдалось значимое уменьшение частоты aberrантных клеток и aberrаций хромосомного типа по сравнению с контролем, что соответствует явлению гормезиса [3]. Гормезис не подтвердился для хроматидных фрагментов, и, как и ранее, не установлен для дицентриков, но был показан для парных фрагментов. Для некоторых типов ХА было выявлено уменьшение порогового уровня дозы облучения. В 2019 г., по сравнению с 2014 г., было выявлено расширение дозового диапазона плато на кривой до 800 мЗв (в 2014 г. – до 500 мЗв), кроме дицентрических хромосом, у которых плато осталось в диапазоне 100–500 мЗв. После 500 мЗв для дицентриков и после 800 мЗв для других типов ХА их частота возрастает прямо пропорционально дозе внешнего облучения. Для кольцевых хромосом, транслокаций, мультиaberrантных клеток и полиплоидов дозовой зависимости установлено не было.

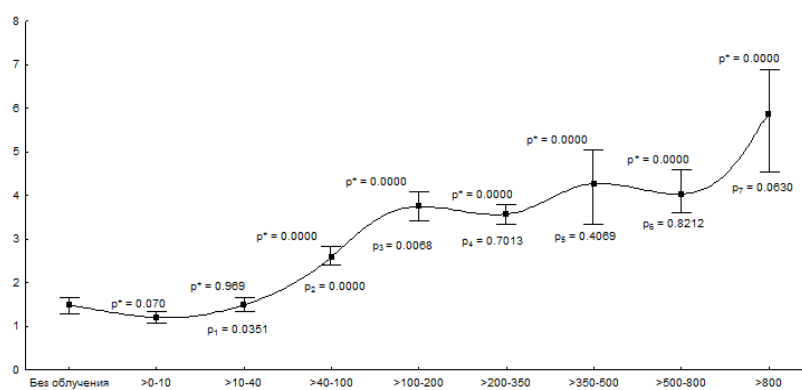


Рис. 1. Зависимость частоты aberrантных клеток у работников СХК от дозы внешнего облучения

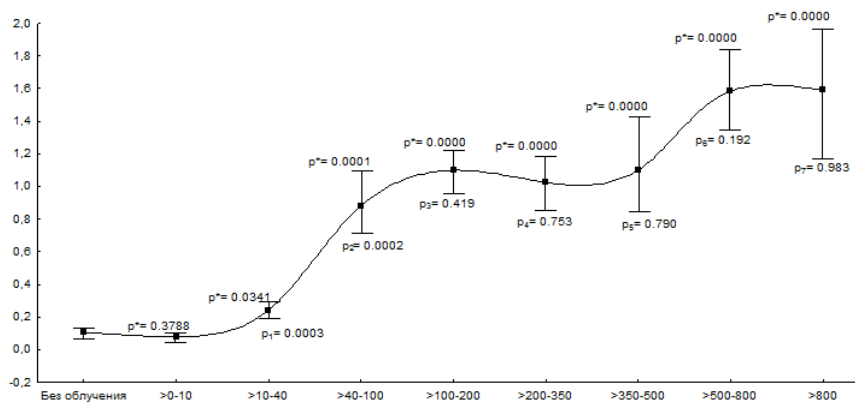


Рис. 2. Зависимость частоты дицентриков у работников СХК от дозы внешнего облучения

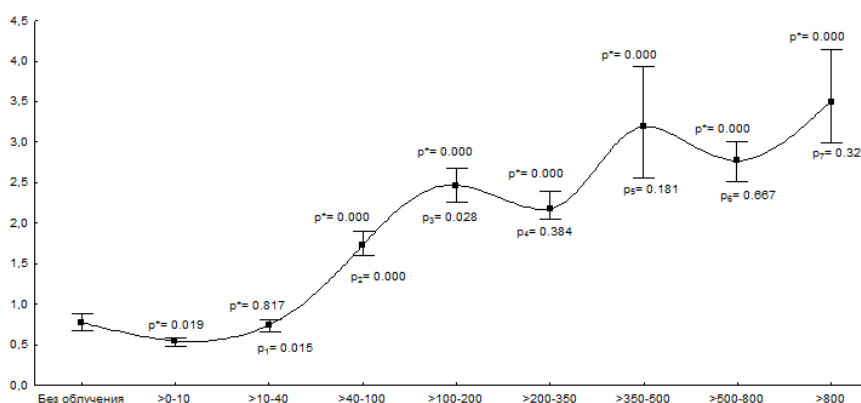


Рис. 3. Зависимость частоты aberrаций хромосомного типа у работников СХК от дозы внешнего облучения

Заключение. Проведенные повторные исследования на расширенной в 2 раза выборке работников СХК, подвергавшихся хроническому облучению, позволили подтвердить основные закономерности, полученные в 2014 г. (отсутствие гендерной зависимости от дозы, значение внешнего облучения, S-образный характер дозовой зависимости, гормезис и др.) и уточнить новые детали (слабая возрастная зависимость, снижение порога, увеличение диапазона плато, S-образная дозовая зависимость для дицентриков и др.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Литвяков Н.В., Фрейдин М.Б., Халюзова М.В., Сазонов А.Э., Васильева Е.О., Альбах Е.Н., Исубакова Д.С., Блинов А.П., Родионова В.И., Кутько А.А., Карпов А.Б., Тахауов Р.М. Частота и спектр цитогенетических нарушений у работников Сибирского химического комбината // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2014. – Т. 54, № 3. – С. 283–296.
2. Любимова Н.Е., Воробцова И.Е. Влияние возраста и низкодозового облучения на частоту хромосомных aberrаций в лимфоцитах человека // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2007. – Т. 47, № 1. – С. 80–85.
3. Ивановский Ю.А. Радиационный гормезис. Благоприятны ли малые дозы ионизирующей радиации? // Вестник ДВО РАН. – 2006. – № 6. – С. 86–91.

**НАРУШЕНИЕ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА В МОДЕЛЬНЫХ
ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГАХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЦИСПЛАТИНА**

Е.О. Казакова, И.В. Ларионова, М.А. Ракина

Научный руководитель: д.б.н., профессор, Н.В. Чердынцева

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

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

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

**DEFECTS OF VESICULAR TRANSPORT IN TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES UNDER
THE CISPLATIN TREATMENT**

E.O. Kazakova, I.V. Larionova, M.A. Rakina

Scientific Supervisor: Ph.D., professor, N.V. Cherdyntseva

National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin Avenue 36, 634050

Cancer Research Institute of TNMRC, Russia, Tomsk, Kooperativny Street 5, 634009

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

***Abstract.** Chemotherapy is one of the main strategies of treatment of solid tumors. Despite advances in cytotoxic therapy, resistance to chemotherapy remains one of the greatest challenges and eventually contributes to death of patients. Tumor-associated macrophages secrete growth factors and inhibits cell death signaling pathways in tumor cells protecting them from the cytotoxic effects of the chemotherapy. In the present research the influence of chemotherapeutic drug cisplatin on the endocytosis in macrophage have been studied. We found that cisplatin causes the defects in endocytosing machinery by reducing membrane biogenesis and vesicular transport that correlates with impaired endocytic uptake of essential ligands, and lead to ineffective clearance function of TAM in tumor microenvironment.*

Введение. Опухولةассоциированные макрофаги (ОАМ) являются основными клетками врожденного иммунитета, которые стимулируют первичный рост опухоли, ангиогенез и метастазирование [1]. Химиотерапия является одной из основных стратегий лечения злокачественных новообразований. Несмотря на успехи в цитотоксической терапии, резистентность к химиотерапии остается одной из самых больших проблем онкологии и, в конечном итоге, способствует гибели онкологических пациентов [2,3]. ОАМ могут накапливаться в опухолях после химиотерапии и вносить вклад в хеморезистентность и рецидив опухоли [4]. Секретируя факторы роста, ОАМ ингибируют апоптоз опухолевых клеток, защищая опухоль от цитотоксического воздействия химиотерапии [4, 5].

Цисплатин представляет собой цитостатический препарат на основе платины, который применяется как самостоятельный препарат, так и в комбинации в схемах химиотерапии, и который имеет широкое применение в химиотерапевтическом лечении многих злокачественных заболеваний, включая рак молочной железы и колоректальный рак [6]. Механизм действия цисплатина на опухолевые клетки известен и связан с нарушением репликации ДНК, однако, механизм его действия на ОАМ требует изучения.

Материалы и методы. Библиотеки для секвенирования готовились с использованием набора NEXT flex Rapid Directional qRNA-SeqKit, а также с использованием индексированных адаптеров NEXTflex-qRNA-8nt-Barcodes (BiooScientific, PerkinElmer Applied Genomics) в соответствии с протоколами производителя. Удаление рибосомальной РНК проводили с помощью набора для удаления РНК NEBNext® (человек / мышь / крыса) (NewEnglandBiolabsinc.).

Полнотранскриптомное секвенирование проводилось в модельных ОАМ, полученных от 4 доноров, на приборе Illumina NextSeq500 (Illumina, США). При помощи программы Gsea (<https://www.biorxiv.org/content/early/2016/06/20/060012>), проводили обогащение РНК по биохимическим и регуляторным путям с использованием списков генов, ранжированных по уровню экспрессии и значению *p*. Для эксперимента использовалась база данных Reactome.

Валидация результатов секвенирования проводилось при помощи ПЦР в режиме реального времени. Выделение РНК из макрофагов производилось с помощью E.Z.N.A, с использованием комплекта Total RNA (OmegaBio-tek, Inc., США) в соответствии с инструкциями производителя. Уровни экспрессии *DNM3*, *STX8*, *DENND1A* и *EHD1* были стандартизированы в соответствии с экспрессией гена домашнего хозяйства (*GAPDH*). Праймеры и зонды (FAM-BHQ1) отбирались с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>). Праймеры и зонды были синтезированы компанией «ДНК-синтез» (Москва, Россия). Амплификация *DNM3*, *STX8*, *DENND1A* и *EHD1* проводилась с использованием ПЦР-системы AriaMxReal-Time (Agilent, США).

Результаты. Нами было показано, что цисплатин уменьшает поглощение и эндоцитарный перенос как классического лиганда для ОАМ - acLDL, так и опухолеспецифического лиганда EGF. Однако цисплатин незначительно влияет на экспрессию скавенджер рецептора стабилина-1 [данные не показаны]. Мы выполнили полнотранскриптомное секвенирование следующего поколения образцов РНК, полученных от модельных ОАМ, дифференцированных в присутствии MCF-7 (рак молочной железы) и Colo206F (рак толстого кишечника). База данных Reactome (<https://reactome.org/PathwayBrowser/>) использовалась для поиска путей, которые участвуют в мембранном транспорте. Мы обнаружили, что воздействие цисплатина приводит к подавлению 635 белков, участвующих в следующих процессах: везикулярный транспорт; эндосомальный сортировочный комплекс, необходимый для транспорта; клатрин-зависимое образование везикул; образование везикул в сети аппарата Гольджи и другие. Проверка достоверности данных секвенирования была выполнена при помощи ПЦР в режиме реального времени для некоторых генов, вовлеченных в эндоцитоз, а именно в эндосомальный транспорт – *DNM3*, *STX8*, *DENND1A* и *EHD1*. Анализ ПЦР показал, что экспрессия генов *DNM3*, *STX8*, *DENND1A* и *EHD1* была снижена под воздействием цисплатина в ОАМ рака молочной железы и рака толстого кишечника (Рис. 1А – Г).

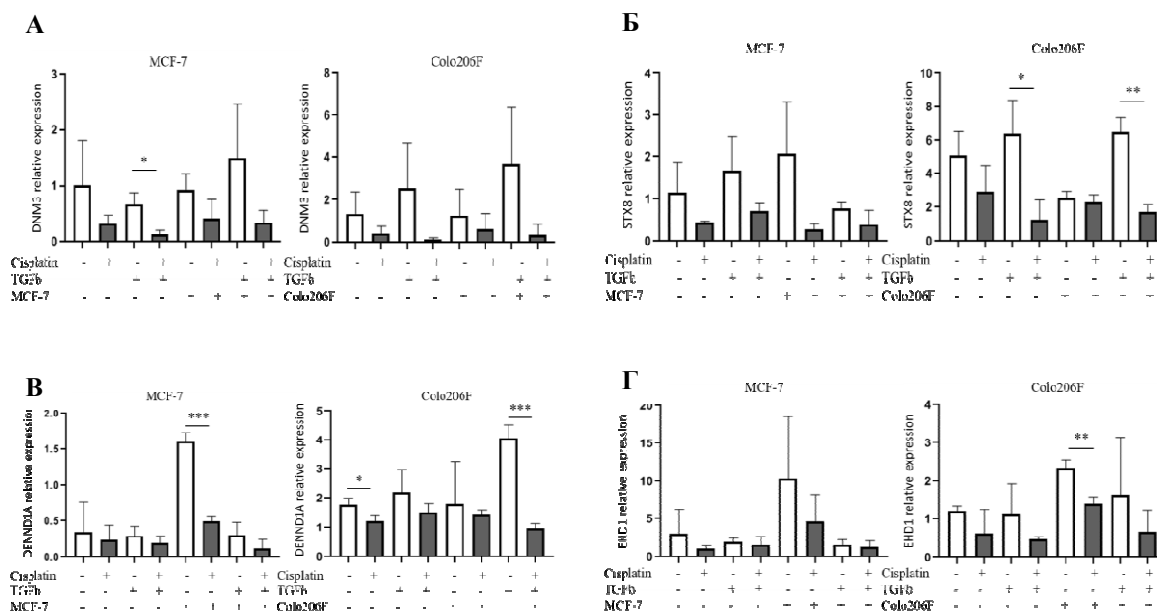


Рис. 1. Уровень экспрессии генов, вовлеченных в эндосомальный транспорт в опухолеассоциированных макрофагах рака молочной железы и рака толстого кишечника под воздействием цисплатина

Заключение. Наши данные показывают, что цисплатин влияет на важные элементы аппарата эндоцитоза в ОАМ. Полученные данные свидетельствуют о нарушении сквенджинг функции ОАМ в опухолевом микроокружении. В свою очередь, повышение уровня значимых для прогрессии опухоли факторов вследствие нарушения их клиренса может привести к рецидиву опухоли, а также к опосредованной цисплатином химиорезистентности раковых клеток.

Работа поддержана грантом РНФ № №14-15-00350.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lewis C.E., Pollard J.W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments // Cancer research. – 2006. – V. 66, №.2. – P. 605-612.
2. Baghdadi M. et al. Chemotherapy-induced IL34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells // Cancer research. – 2016. – V. 76, №.20. – P. 6030-6042.
3. Hughes R. et al. Perivascular M2 macrophages stimulate tumor relapse after chemotherapy // Cancer research. – 2015. – V. 75, №.17. – P. 3479-3491.
4. De Palma M., Lewis C.E. Cancer: Macrophages limit chemotherapy // Nature. – 2011. – V. 472, №.7343. – P. 303.
5. Mantovani A., Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages // Journal of Experimental Medicine. – 2015. – V. 212, №.4. – P. 435-445.
6. Dasari S., Tchounwou P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action // European journal of pharmacology. – 2014. – V.740. – P. 364-378.

**РОЛЬ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЦИТОКИНА IL-10 ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ
ХЛОРИДОМ ТРИМЕТИЛОЛОВА**

Э.Р. Камалтдинова, Е.В. Першина

Научный руководитель: д.б.н. В.И. Архипов

Пушкинский государственный естественно-научный институт,

Россия, г. Пушкино, просп. Науки, 3, 142290,

Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН),

Россия, г. Пушкино, ул. Институтская, 3, 142290

E-mail: alissa94@mail.ru

**ROLE OF ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE IL-10 DURING INTOXICATION WITH
CHLORIDE TRIMETHYLITIN**

E.R. Kamaltdinova, E.V. Pershina

Scientific Supervisor: Dr. V.I. Arkhipov

Pushchino State Institute of Natural Science, Russia, Pushchino, Nauki pr., 3, 142290

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences (ITEB RAS),

Russia, Pushchino, Institutskaya str., 3, 142290

E-mail: alissa94@mail.ru

Abstract. *In this study, gene expression of IL-10 and its receptors in the hippocampus and the prefrontal cortex of rats were studied at 1.3 and 6 weeks after exposure to TMT (7.5 mg / kg). Increased expression of COX-2, as well as IL-10 and its receptors after TMT intoxication indicates an active development of neuroinflammation in these structures. Taking into account that neuronal death is more significant in the hippocampus, it can be concluded that even increased expression of IL-10 and receptors for this cytokine are not effective enough to save neurons.*

Введение. Изучение механизмов нейродегенерации является актуальной проблемой ввиду отсутствия эффективной терапии нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз и др. В работе применяли экспериментальную модель нейродегенеративных изменений в гиппокампе, вызванных хлоридом триметилолова (ТМТ) для изучения влияния интерлейкина-10 (IL-10) и его рецепторов в механизме нейровоспаления.

Водорастворимый нейротоксикант ТМТ вызывает токсическое воздействие на центральную нервную систему – отек мозга, расширение желудочков и гибель нейронов, особенно выраженную в гиппокампе [1]. Предполагается, что первичной мишенью действия ТМТ являются митохондрии, при воздействии на которые в мозге наблюдается активация провоспалительных цитокинов, нарушение кальциевого обмена, индукция апоптоза [2]. Преимущество экспериментальной модели с использованием ТМТ – протекание нейродегенерации в течение нескольких недель, что позволяет провести измерения в динамике [3]. Противовоспалительный цитокин IL-10, экспрессия которого резко возрастает при воспалительных реакциях, обладает способностью подавлять синтез провоспалительных цитокинов и снижать активность макрофагов [4].

Материалы и методы Эксперименты проводились на самцах крыс линии Вистар (n=24) весом 200-220 г. Животных содержали в соответствии с директивой 1986 Совета Европейского сообщества. После введения ТМТ (7,5 мг/кг, п/к) у животных наблюдали снижение веса, агрессию, судорожную активность. Для предотвращения судорог вводили нембутал в дозе 20 мг/кг, в/б. Экспрессию генов IL-10 и его рецепторов определяли через 1, 3 и 6 недель после ТМТ-интоксикации. Выделение РНК из гомогенатов гиппокампа и префронтальной коры проводили согласно протоколу к «RNeasy Mini Kit (50) (QIAGEN)». Измерение концентрации тотальной РНК производили спектрофотометрически, качество РНК оценивали электрофоретически в 1% агарозном геле. Обратную транскрипцию проводили по стандартному протоколу к набору реактивов для обратной транскрипции (Fermentas, Литва). Дизайн ген-специфичных праймеров производили на основе баз данных NCBI GenBank [5]. Индуцибельный фермент циклооксигеназа-2 (СОХ-2) был выбран как маркер нейровоспаления. В качестве референсного использовали ген бета-актина. Праймеры, обозначенные как «R» или «reverse» были использованы для получения кДНК-копий, а обозначенные как «F» или «forward», были использованы как парные для амплификации.

Actb F 5'ATGGTGGGTATGGGTCAGAA3'
 R 5'CTTTTCACGGTTGGCCTTAG3'
COX-2 F 5'GCTTTCTCCAACCTCTCCTACTACA3'
 R 5'-CATGGGAGTTGGGCAGTCA-3
Il10 F 5'GTTGCCAAGCCTTGTCAGA3'
 R 5'GCTTCTCTCCCAGGGAATTCAA3'
Il10ra F 5'CTCGCTTCACAGTGGATGAA3'
 R 5'TAAATGCGGTGGTGCCTGAA3'
Il10rb F 5'TCAGCATGGTGTGGTTCATT3'
 R 5'TCTTCCGTGATGATGCTCAG3'

ОТ-ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе “DT-lite S4” (ДНК-Технология, Россия). После завершения амплификации во всех случаях качество и молекулярный вес ПЦР-продуктов оценивали электрофоретически в 3% агарозном геле. Достоверность полученных данных оценивали по критерию Манна-Уитни с использованием программы GraphPad Prism 5.0.

Результаты. В гиппокампе уровень мРНК СОХ-2 оказался повышенным через одну и три недели после инъекции ТМТ (Рис. 1А), а в префронтальной коре – через 3 и 6 недель (Рис. 1Б), что свидетельствует о развитии нейровоспаления в эти сроки. Экспрессия противовоспалительного цитокина IL-10 также была повышена, как в гиппокампе, так и в префронтальной коре через 1 и 3 недели после ТМТ-интоксикации. Существенные различия между гиппокампом и префронтальной корой выявлены при исследовании мРНК рецепторов к IL-10. В гиппокампе было обнаружено значительное повышение мРНК для IL-10RA через 3 недели после инъекции ТМТ, а в префронтальной коре в этот период наблюдалось снижение экспрессии гена этого рецептора. Через 6 недель после ТМТ-интоксикации уровень мРНК для СОХ-2 и IL-10 нормализовался, что может свидетельствовать о завершении стадии активного нейровоспаления. Тем не менее, экспрессия рецепторов для IL-10 осталась повышенной.

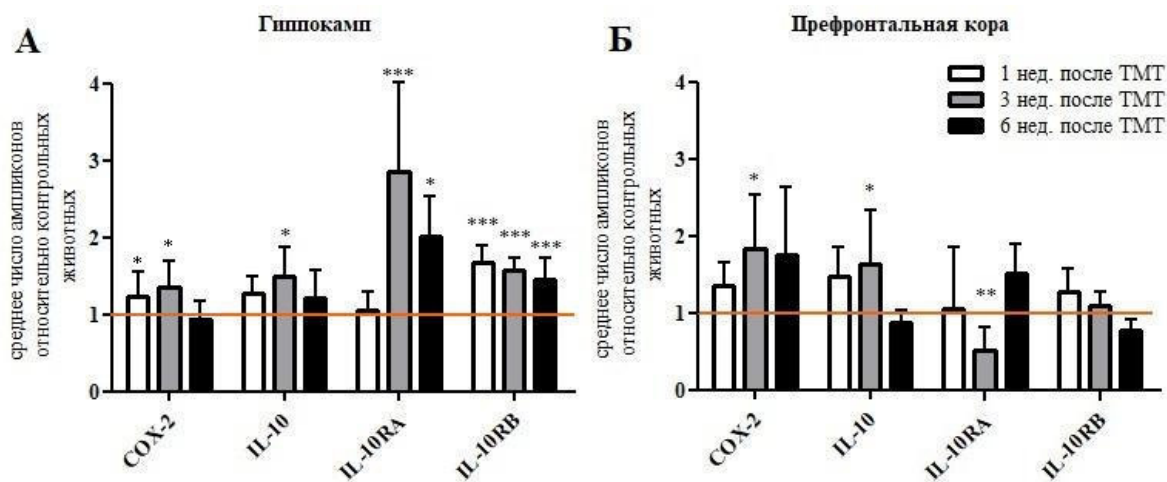


Рис. 1. Уровень экспрессии генов в гиппокампе и префронтальной коре мозга крыс через 1, 3 и 6 недель после ТМТ (уровень экспрессии контрольных животных принят за единицу, горизонтальная линия). Указано значение $M \pm SD$; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$, *** – $p < 0,0001$, относительно контрольных животных по критерию Манна-Уитни

Заключение. Динамика экспрессии генов COX-2, а также IL-10 и его рецепторов в гиппокампе и префронтальной коре после ТМТ-интоксикации указывает на активное развитие нейровоспаления в этих структурах. Принимая во внимание, что гибель нейронов более выражена в гиппокампе, можно заключить, что даже повышенная экспрессия IL-10 и его рецепторов недостаточно эффективна для сохранения нейронов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Першина Е.В., Михеева И.Б., Камалтдинова Э.Р., Архипов В.И. Морфофункциональные изменения в гиппокампе крыс после воздействия хлорида триметиллолова // Цитология. – 2018. – Т. 60, № 7. – С. 544-548.
2. Geloso M.C., Corvino V., Michetti F. et al. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes // Neurochem Int. – 2011. – Vol. 58, № 7. – P. 729-38.
3. Pershina E.V., Mikheeva I.B., Kamaltdinova E.R., Arkhipov V.I. Expression of mGlu receptor genes in the hippocampus after intoxication with trimethyltin // J Mol Neurosci. – 2019. – 67. – P. 258-264.
4. Lobo-Silva D., Carriche G.m., Castro A.G., Roque S., Saraiva M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation // J Neuroinflammation. – 2016. – 13 – P. 297.
5. База данных NCBI GenBank BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (дата обращения: 04.03.2018).

**ИНФИЛЬТРАЦИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА M1- И M2- МАКРОФАГАМИ
У ПАЦИЕНТОВ С ИНФАРКТОМ МИОКАРДА**

Б. Ким¹, М.С. Ребенкова¹, А.Э. Гомбожапова¹

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

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

²Сибирский государственный медицинский университет

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

E-mail: kim_boris@list.ru

**INFILTRATION OF THE HUMAN'S BRAIN M1- AND M2-MACROPHAGES IN PATIENTS WITH
MYOCARDIUM INFARCT**

B. Kim¹, M.S. Rebenkova¹, A.E. Gombozhapova¹

Scientific Supervisors: Prof., MD, Dr. E.G. Churina^{1,2}, Prof., MD, Dr. V.V. Ryabov^{1,2}

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

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

E-mail: kim_boris@list.ru

Abstract. *Myocardial infarction (MI) remains the leading cause of mortality all over the world. The development of acute organic brain syndrome significantly increase lethality rate. However, pathogenesis of acute organic brain syndrome is less clear. One of available mechanism is low-grade neuroinflammation. Glial macrophages are key cells, which may perform inflammation in the brain. This study investigated the temporal dynamics of common macrophage population and M2 macrophages in brain following fatal M type 1.*

Введение. Наша концепция заключается в том, что возникшее при инфаркте миокарда нейровоспаление является одним из наиболее значимых патогенетических механизмов развития соматогенного делирия. Основным эффекторным звеном нейровоспалительных реакций является микроглия, представляющая собой резидентные макрофаги головного мозга [1]. В физиологических условиях клетки микроглии находятся в функционально покоем состоянии (M0), выполняя функцию поддержания гомеостаза и фагоцитоза апоптотических клеток. Активация микроглии в зависимости от микроокружения приводит к появлению провоспалительных M1- либо противовоспалительных M2- макрофагов [2]. Соотношение классически (M1) и альтернативно (M2) активированных микроглиальных клеток влияет на прогрессирование заболеваний ЦНС. Классическая активация микроглии (M1) приводит к развитию нейровоспалительного иммунного ответа и опосредует неблагоприятные влияния на нейроны, тогда как альтернативная активация (M2) играет решающую роль в защите и репарации тканей [3]. Кроме того, микроглия может приобретать промежуточные фенотипы, характеризующиеся экспрессией различных M1- и M2-маркеров, что указывает на способность микроглиальных клеток трансформироваться при помощи цитокинов и других биологически активных веществ. Одним из наиболее интересных и активно изучаемых в последнее время маркеров M2-фенотипа является stabilin-1. В ряде работ было показано, что stabilin-1 обладает противовоспалительной

активностью и препятствует развитию фиброза при хроническом воспалении, однако исследования роли stabilin-1 в развитии нейровоспаления единичны. Цель настоящей работы – изучить временную динамику макрофагальной инфильтрации ($CD68^+$ и $stabilin-1^+$) в головном мозге пациентов, умерших от инфаркта миокарда I типа.

Материалы и методы. Материалом для настоящей работы послужили фрагменты головного мозга из подкорковых ядер, взятые во время аутопсии пациентов ($n=31$). Критериями исключения являлись наличие инфекционных заболеваний и осложнений, онкологических заболеваний, клапанных пороков, требующих хирургического лечения, смерть, которая не была обусловлена инфарктом миокарда I типа. Макрофагальную инфильтрацию оценивали с помощью иммуногистохимического исследования, были использованы мышиные моноклональные антитела к общему маркеру макрофагов CD68 (Cell Marque, 168M-95) и кроличьи поликлональные антитела к маркеру M2-макрофагов stabilin-1 (некоммерческие антитела). Для визуализации исследованных маркеров применялась система HRP-DAB. Иммуногистохимическое окрашивание проводилось по стандартному протоколу. Подсчёт $CD68^+$ и $stabilin-1^+$ макрофагов в головном мозге и контрольных образцах производился при оптическом увеличении $\times 400$ в 20 случайных полях зрения на микроскопе Axio Imager M2, Zeiss в светлом поле. В зависимости от давности инфаркта сформировано две группы: группа 1 – пациенты, умершие в период до 3-х суток острого инфаркта миокарда (ОИМ) ($n=19$), группа 2 – умершие в период с 4-х до 28-х суток ОИМ ($n=12$). В качестве контроля (группа 3) использованы фрагменты головного мозга здоровых людей 18-40 лет, умерших от несовместимой с жизнью травмы ($n=10$). Обработка данных проводилась с использованием пакета программ «Statistica 10.0». Применялись методы описательной статистики, ранговый анализ вариаций по Краскаллу-Уоллису, корреляционный анализ по Спирмену. Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$.

Результаты. Средний возраст пациентов составил 73 ± 10 лет. Причиной смерти большинства пациентов являлся истинный кардиогенный шок. Иммуногистохимическое исследование показало, что в головном мозге здоровых людей (группа 3) присутствовали как $CD68^+$ (4,00 (2,0;6,0)), так и $stabilin-1^+$ (3,0 (1,0;5,0)) макрофаги, при этом количество $CD68^+$ и $stabilin-1^+$ макрофагов было небольшим и практически одинаковым (Рис. 1).

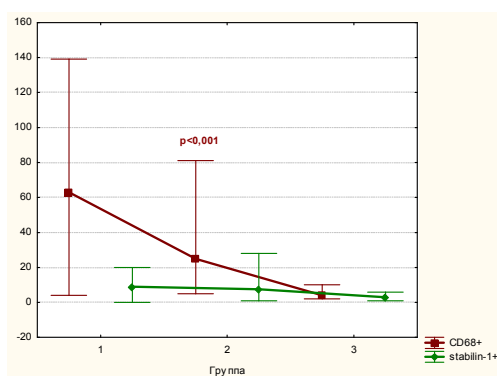


Рис. 1. Количество $CD68^+$ и $stabilin-1^+$ макрофагов в головном мозге в 20 полях зрения $\times 400$ в разные сроки инфаркта миокарда. Медиана; Whisker: минимальное и максимальное значение выборки

В течение первых 3-х суток инфаркта миокарда (группа 1) количество $CD68^+$ макрофагов в головном мозге по сравнению с контрольными значениями было выше (63,0 (20,0;90,0) и 4,00 (2,0;6,0)) более чем в 15 раз. При этом количество $stabilin-1^+$ макрофагов статистически значимо не изменялось

(9,0 (5,0;12,0) и 3,0 (1,0;5,0)) (Рис. 2). С 4-х по 28-е сутки инфаркта миокарда (группа 2) интенсивность инфильтрации ткани головного мозга CD68⁺ макрофагами была ниже (25,0 (14,0;42,5)), чем в группе 1. Однако их количество оставалось статистически значимо большим, чем в группе контроля. Количество stabilin-1⁺ макрофагов (7,50 (4,0;15,5)) оставалось практически прежним и не отличалось от показателей группы контроля. При проведении корреляционного анализа выявлена прямая связь между количеством CD68⁺ клеток в миокарде в зоне инфаркта ($R=0,34$, $p<0,05$), перинфарктной ($R=0,35$, $p<0,05$) и неинфарктной ($R=0,44$, $p<0,05$) зонах и количеством соответствующих клеток в головном мозге. Обнаружена прямая корреляция между количеством CD68⁺ макрофагов в неинфарктной зоне миокарда и stabilin-1⁺ клеток в головном мозге ($R=0,33$, $p>0,05$) и обратная корреляция между количеством stabilin-1⁺ в неинфарктной зоне миокарда и количеством CD68⁺ клеток в головном мозге ($R=-0,44$, $p>0,05$). Зависимости между количеством лейкоцитов и моноцитов периферической крови и выраженностью макрофагальной инфильтрации головного мозга выявлено не было. Корреляционной связи между выраженностью CD68⁺ и stabilin-1⁺ макрофагальной инфильтрацией в головном мозге и наличием сахарного диабета, перенесённых ранее инсультов и инфарктов, предшествующей инфаркту стенокардии не выявлено.

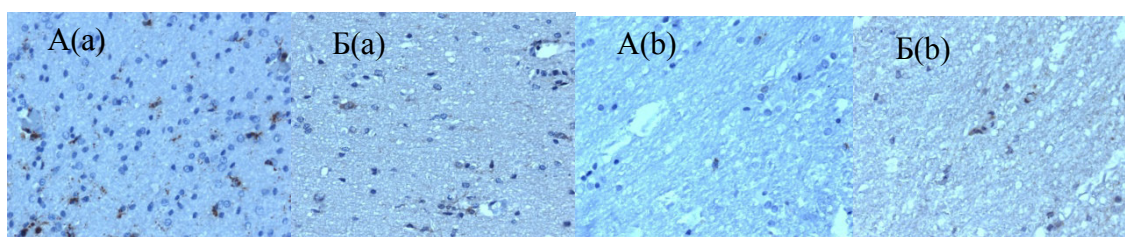


Рис. 2: CD68⁺ (А) и stabilin-1⁺ (Б) макрофаги в головном мозге у пациента с инфарктом миокарда давностью 2 суток (а) и в группе контроля (б). Иммуногистохимическое исследование, х400

Заключение. В результате проведённого исследования выявлено, что количество CD68⁺ М1-макрофагов в головном мозге значительно увеличивается в течение первых трёх суток инфаркта миокарда. В тоже время, количество stabilin-1-позитивных М2-макрофагов в головном мозге пациентов, умерших от инфаркта миокарда, статистически значимо не отличается от контрольных значений и не меняется на протяжении всего периода заживления инфаркта миокарда. Выявлена взаимосвязь между количеством CD68⁺ М1-макрофагов в головном мозге и миокарде пациентов, умерших от инфаркта миокарда 1 типа. Корреляционных связей между количеством CD68⁺ и stabilin-1⁺ макрофагов в головном мозге и наличием коморбидной патологии не выявлено. Полученные данные могут быть использованы для поиска новых молекулярных диагностических и терапевтических мишеней при разработке методов иммунобиотерапии, способствующих предотвращению нейровоспаления и обусловленных им осложнений при инфаркте миокарда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Block M.L., Hong J.-S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism // Prog. Neurobiol. – 2005. – vol. 76, №77. – P. 98.
2. Kaur C., Rathnasamy G., Ling E.A. Biology of Microglia in the Developing Brain // J Neuropathol Exp Neurol. – 2017. – vol. 76, №9. – P. 736-753.
3. Jha M. K., Lee W. H., Suk K. Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders // Biochem Pharmacol. – 2016. – vol. 1, №103. – P. 1-16.

УЧАСТИЕ М-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ И АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЦА

Б.К. Курбатов, Е.С. Прокудина

Научный руководитель: профессор д.м.н. Л.Н. Маслов

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, НИИ кардиологии,

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

E-mail: bobersanker@gmail.com

INVOLVEMENT OF M-CHOLINOROCEPTORS AND ADDRESSORATORS IN IN THE PATHOGENESIS OF STRESS-INDUCED HEART INJURY

B.K. Kurbatov, E.S. Prokudina

Scientific Supervisor: Prof., Dr. L.N. Maslov

Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Cardiology Research Institute,

Russia, Tomsk, Kyevsckaya st., 111A, 634012

E-mail: bobersanker@gmail.com

Abstract. *Stress-induced heart injury (SIHI) was reproduced by immobilizing rats on the back for 24 hours. SIHS was assessed by the accumulation of ^{99m}Tc -pyrophosphate in the heart. It has been established that the depletion of endogenous catecholamine reserves contributes to an increase in heart tolerance to the action of animal immobilization. Mobilization of endogenous catecholamines causes damage to the heart. Peripheral M-cholinergic receptor block has affect stressful heart damage. $\alpha 1$ -Adrenoreceptor does not play a significant role in the pathogenesis of SIHI. It has been established that the blockade of $\alpha 2$ -adrenergic receptor contributes to the enhancement of SIHI. It has been shown that activation of $\beta 1$ -adrenergic receptor plays an important role in SIHI. $\beta 2$ - and $\beta 3$ -adrenergic receptors do not play a significant role in SIHI. it has been established that activation of the adrenergic system plays a key role in the pathogenesis of stress-induced heart injury.*

Введение. В 1974 г G. Johansson и соавт. в исследовании, выполненном на свиньях, обнаружили существование стресс-индуцированной кардиомиопатии [1]. В 1977 г D.G. Miller и S Mallov предложили метод количественной оценки стресс-индуцированного повреждения сердца (СИПС), метод был основан на применении радиоактивного ^{99m}Tc -пирофосфата [2]. В 1990 г Н. Sato и соавт. обнаружили существование стресс-индуцированной кардиомиопатии у человека [3]. Они назвали это патологическое состояние «синдромом такотсубо» (СТ), поскольку сердце пациентов принимало форму ловушки для осьминогов – тако-тсубо. Данный синдром характеризуется такими поднятием сегмента ST, удлинение QTc, и повышение уровня маркеров некроза миокарда. Синдром такотсубо является тяжёлым патологическим состоянием, при котором смертность сопоставима со смертностью при остром инфаркте миокарда с подъёмом сегмента ST [4]. Хотя точный механизм развития этой кардиомиопатии неизвестен, были предложены различные теории, такие как катехоламиновая кардиотоксичность, спазм коронарных артерий, коронарная микрососудистая недостаточность и дефицит эстрогена. Были описаны случаи при которых развитие синдрома такотсубо являлось вторичным по отношению к норэпинефрин-секретирующих и допамин-секретирующих феохромоцитомах [5]. Неоднозначность участия

вегетативной нервной системы показывает исследование, проведенное в клинику Майо, показало, что уровень фракционированных катехоламинов и метэфринов в моче у пациентов, страдающих данным заболеванием, оказался в норме [6]. Таким образом, целью нашего исследования является определить роль м-холинорецепторов и адренорецепторов в патогенезе стресс-индуцированного повреждения сердца.

Методы исследования. Стресс-индуцированное повреждение сердца (СИПС) воспроизводили с помощью иммобилизации крыс на спине на 24 ч. СИПС оценивали по аккумуляции ^{99m}Tc -пирофосфата в сердце. Количественную оценку стрессорного повреждения сердца осуществляли по аккумуляции радиофармпрепарата ^{99m}Tc -пирофосфата (^{99m}Tc -ПФ) в миокарде по методу, предложенному D.G. Miller и S. Mallov [2]. Радиофармпрепарат, полученный с помощью генератора технеция ТЕКСИС (Франция), вводили внутривенно в дозе 150 МБк/кг через 30 мин после прекращения иммобилизации. Через 100 минут после инъекции животных декапитировали под эфирным наркозом. Включение ^{99m}Tc -ПФ в ткань миокарда рассчитают в процентах от введённой дозы на 1 г ткани. Регистрацию радиоактивности осуществляли с помощью гамма-камеры «Philips Forte», Philips (Нидерланды).

Препараты вводили внутривенно 2 раза: первая инъекция осуществлялась за 30 мин до иммобилизации и через 12 ч после иммобилизации (за исключением гуанетидина и гексаметония). Для фармакологической денервации использовали ганглиоблокатор гексаметония хлорид, который вводили пятикратно в дозе 20 мг/кг с интервалом 4 ч 48 мин. Химическую симпатэктомию вызывали с помощью введения гуанетидина. Гуанетидин (50 мг/кг) вводили подкожно раз в день в течение трёх дней, последнюю инъекцию делали за 24 ч до иммобилизации. Эффект мобилизации эндогенных катехоламинов оценивали с помощью совместного применения клоргиллина и тирамина. Тирамин вызывает мобилизацию эндогенных катехоламинов, его вводили в дозе 10 мг/кг. Ингибитор моноаминоксидазы, клоргилин вводили в дозе 2 мг/кг. Для блокады периферических М-холинорецепторов использовали атропина метилнитрат, который вводили двукратно в дозе 1 мг/кг. Празозин (2 мг/кг) использовали для блокады α_1 -АР. Йохимбин, антагонист α_2 -АР, вводили в дозе 2 мг/кг. Селективный антагонист β_1 -АР небиволол использовали в дозе 1,2 мг/кг. Селективный антагонист β_2 -АР ICI 118,551 применяли в дозе 0,3 мг/кг. Селективный β_3 -блокатор L-748337 вводили в дозе 0,1 мг/кг.

Результаты. В ходе проведенного нами исследования было установлено, что при иммобилизации катехоламинов введением клоргиллина (2 мг/кг) и тирамина (10 мг/кг) происходит усиление аккумуляции ^{99m}Tc -пирофосфата в миокарде на 25,7 % что свидетельствует о усилении СИПС. Также нами было обнаружено, что блокада α_2 -адренорецепторов йохимбином также усиливает СИПС в 2,2 раза. Блокада β_1 -адренорецепторов небивололом (1,2 мг/кг) уменьшает степень СИПС в 2,5 раза. При трехдневном введении гуанетидина (50 мг/кг) наблюдается снижение степени аккумуляции ^{99m}Tc -пирофосфата в миокарде на 36%. При введении атропина метилнитрата (1мг/кг) произошло снижение СИПС на 35%. Вместе с тем нам не удалось обнаружить эффект от блокады β_2 -и β_3 -адренорецепторов, Фармакологическая денервация сердца ганглиоблокатором гексаметонием хлоридом (50 мг/кг) не оказала эффекта на СИПС (табл.1).

Таблица 1

Аккумуляция ^{99m}Tc -ПФ в миокарде самок крыс при введении внутривенно введение различных фармакологических агентов

Группа	Аккумуляция ^{99m}Tc -ПФ в контрольной группе, СРМ, % от введенной дозы на 1 г. миокарда	Аккумуляция ^{99m}Tc -ПФ в опытной группе, СРМ, % от введенной дозы на 1 г. миокарда
Клоргилин + тирамин	0,049 ± 0,0018	0,066 ± 0,0041*
йохимбин	0,083 ± 0,0075	0,189 ± 0,032*
небиволол	0,1358 ± 0,0135	0,0532 ± 0,0068*
гуанетидин	0,139 ± 0,0089	0,089 ± 0,0087*
атропин метилнитрат	0,083 ± 0,0085	0,061 ± 0,0043*
ICI 118,551	0,078 ± 0,01	0,097 ± 0,028
L-748337	0,1501 ± 0,0182	0,1482 ± 0,0170
гексаметоний хлорид	0,0997 ± 0,009	0,100 ± 0,0008

Примечание: * - $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Закключение. Таким образом, было установлено, что истощение запасов эндогенных катехоламинов способствует повышению толерантности сердца к действию иммобилизационного стресса у животных. Мобилизация эндогенных катехоламинов вызывает повреждение сердца. Блокада периферических М-холинорецепторов снижает уровень стрессорного повреждение сердца. α_1 -Адренорецепторы не играют существенной роли в патогенезе стресс-индуцированного повреждения сердца. Установлено, что блокада α_2 -адренорецепторов способствует усилению СИПС. Блокада β_1 -адренорецепторов играет важную роль в СИПС. β_2 - и β_3 -Адренорецепторы не играют существенной роли в СИПС. Следовательно, симпатoadреналовая система и, в частности, β_1 -адренорецепторы, играют важную роль в СИПС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johansson G. et al. Severe stress-cardiopathy in pigs // Am. Heart J. – 1974. – Vol. 87, № 4. – P. 451–457.
2. Miller D.G., Mallov S. Quantitative determination of stress-induced myocardial damage in rats // Pharmacol. Biochem. Behav. – 1977. – Vol. 7, № 2. – P. 139–145.
3. Sato H. Tako-tsubo-like left ventricular dysfunction due to multivessel coronary spasm // Clin. Asp. Myocard. Inj. from ischemia to Hear. Fail. – 1990. – P. 56–64.
4. Stiermaier T. et al. Long-term excess mortality in takotsubo cardiomyopathy: predictors, causes and clinical consequences // Eur. J. Heart Fail. – 2016. – Vol. 18, № 6. – P. 650–656.
5. Y-Hassan S. Clinical Features and Outcome of Pheochromocytoma-Induced Takotsubo Syndrome: Analysis of 80 Published Cases. // Am. J. Cardiol. – 2016. – Vol. 117, № 11. – P. 1836–1844.
6. Madhavan M. et al. Stress hormone and circulating biomarker profile of apical ballooning syndrome (Takotsubo cardiomyopathy): insights into the clinical significance of B-type natriuretic peptide and troponin levels. // Heart. – 2009. – Vol. 95, № 17. – P. 1436–1441.

ЗАМКНУТЫЙ МИР РАСТЕНИЙ

Д.С. Лазорин

Научный руководитель: А.В. Мелентьева

Муниципальное автономное общеобразовательное учреждение средняя общеобразовательная школа №47

Россия, г. Томск, ул. Пушкина 54/1, 634006

E-mail: dmitriyhernov1@yandex.ru

CLOSED WORLD OF PLANTS

D.S. Lazorin

Scientific Supervisor: A.V. Melentyeva

Municipal autonomus educational institution secondary school №47, Russia, Tomsk, st. Pushkina 54/1, 634006

E-mail: dmitriyhernov1@yandex.ru

Abstract. *In this work, studies are conducted on the development of various plant species in closed ecosystems. The goal: it is to determine the conditions of existence of various plant species in closed ecosystems, to determine the factors influencing the destruction of florariums, to determine the conditions for the long existence of ecosystems and to create a stable closed ecosystem. As a result, optimal conditions for the existence of plants in closed ecosystems were established, stable closed ecosystems were created, it was determined that conditions suitable for the existence of various plant species were created inside the florarium.*

Введение. Интерес научного сообщества к проблемам биосферы непрерывно растёт, особенно в последние годы, под влиянием ощущения надвигающегося глобального экологического кризиса. Мы знаем довольно много о том, как устроена глобальная экосистема, но о том, как работает эта гигантская биологическая машина и как ей удаётся гармонично существовать на протяжении миллиардов лет, обходя мощнейшие преграды и катаклизмы, известно очень мало. Изучение биосферных процессов на базе создания миниатюрных аналогов экосистем – важнейшая задача человечества [1]. Одной из разновидностей замкнутых экосистем являются флорариумы. Florarium – в буквальном переводе с латинского «вместилище для цветов», то есть место, которое создано в помещении для растений [2]. Другими словами, флорариум - специальная закрытая емкость, изготовленная чаще всего из стекла и предназначенная для содержания и разведения растений, внутри которой создается определенная влажность и температура воздуха. Создается замкнутая экосистема - экосистема, не взаимодействующая каким-либо обменом веществом с внешней средой. Субстраты для флорариума могут самые разнообразные. Гравий и щебень – самый распространенный и долговечный субстрат. Обычно берут кремневый или кварцевый гравий либо гранитовую щебенку. Величина частиц гравия или щебни имеет очень большое значение. Гравий и щебень не должны содержать углекислый кальций: он может подщелачивать раствор и вызывать выпадение фосфатов в виде нерастворимого осадка. В зарубежной практике цветоводства наряду с неорганическими субстратами широко применяют органические, главным образом торф в виде крошки и мох. Мох обладает большой гигроскопичностью и водоудерживающей способностей. Целью исследования является определение оптимальных условий для существования растений с разными требованиями к влажности среды в условиях замкнутой экосистеме [3].

Экспериментальная часть. Создание флорариума можно разделить на несколько этапов: Подготовительный – сбор необходимых материалов и компонентов, Структурный - формирование слоев и заселение, Заключительный – герметизация и подбор подходящих температурных условий. Основными методами работы являются эксперимент, наблюдение и сравнение. Для создания флорариума необходимы следующие компоненты: прозрачная емкость с плотной крышкой, дренаж, плодородная почва и растения.

В работе создано несколько флорариумов, первый из которых создан значительно раньше остальных и был заселен 5 видами растений. За время его существования внутри замкнутой экосистемы погибло только одно растение – пеперомия туполистная. Остальные виды (мох, хлорофитум капский, бегония тигровая, алоэ древовидное), приспособились к условиям среды и продолжают развиваться.

Для того, чтобы иметь более полную картину об устойчивости замкнутых экосистем, было создано еще три флорариума с одинаковым строением (объем 500 мл, дренажные камни одного образца, плодородная почва одного образца, мох с одной территории), отличающиеся только видами посаженных растений. Для данных флорариумов были выбраны виды с различными требованиями к условиям среды: кактус рода эхинопсис (ксерофит), бегония тигровая (гигрофит) и хлорофитум капский (мезофит). Пятый флорариум отличался объемом емкости – 750 мл. Остальные части строения не отличались от предыдущих флорариумов. В данном объекте была посажена традесканция фиолетовая.

Во всех объектах, кроме флорариума с бегонией, сформировалась среда благоприятная для существования выбранных видов растений. А в некоторых из них, появились мошки, которые были жизнеспособны в течение 10 дней. Бегония погибла через неделю после создания флорариума.

В связи с гибелью бегонии, было решено создать еще три экосистемы с бегонией тигровой. Почва, дренажные камни и растения – не отличались от предыдущего образца, а мох пришлось добывать в зимних условиях из под сугробов. Объем воды различался в каждом из созданных флорариумов от 25 мл до 75 мл. Во всех трех флорариумах бегонии начали погибать. Очевидно, на разрушение флорариума повлияла среда, которую мох, добытый в зимних условиях, не смог обеспечить в полном объеме. Для подтверждения данных необходимо повторить эксперимент с мхом, добытым в весеннее время года.

Результаты. Проведенные исследования показали изменения во флорариумах приведенные в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительная характеристика флорариумов с разными видами растений

№	Дата создания	Объем емкости	Объем заливаемой воды	Компоненты	Растения	Изменения
1	30.01.2018	500 мл	10 мл	Камни, почва, песок, раковина моллюска.	Мох, хлорофитум капский, бегония тигровая, пеперомия туполистная, алоэ древовидное.	Через 6 месяцев погибла пеперомия туполистная.

2	20.12.2018	500 мл	30 мл	Дренажные камни, плодородная почва.	Мох, хлорофитум капский.	Среднее количество влаги на стенках банки. Произрастает мох, активное развитие корневой системы хлорофитума.
3	20.12.2018	500 мл	30 мл	Дренажные камни, плодородная почва.	Мох, тигровая бегония.	1 неделя: большое выделение влаги, гибель бегонии. Наблюдается произрастание мха.
4	20.12.2018	500 мл	30 мл	Дренажные камни, плодородная почва.	Мох, кактус рода эхинопсис.	Малое выделение влаги. Спустя 2 недели: кактус дал корни. Увеличение выделения влаги.
5	20.12.2018	750 мл	30 мл	Дренажные камни, плодородная почва.	Мох, градесканция фиолетовая.	Значительное выделение влаги, развитие мха, через 2 недели появились мошки.
6	4.02.2019	500 мл	25 мл	Дренажные камни, плодородная почва.	Мох (добытый в зимних условиях), тигровая бегония.	Гибель бегонии через 2 дня
7	4.02.2019	500 мл	50 мл	Дренажные камни, плодородная почва.	Мох (добытый в зимних условиях), тигровая бегония.	Гибель бегонии через 2 дня
8	4.02.2019	500 мл	75 мл	Дренажные камни, плодородная почва.	Мох (добытый в зимних условиях), тигровая бегония.	Гибель бегонии через 2 дня
9	26.02.2019	500 мл	25 мл	Дренажные камни, плодородная почва.	Мох, тигровая бегония.	Бегония прижилась, появились мошки
10	26.02.2019	500 мл	50 мл	Дренажные камни, плодородная почва.	Мох, тигровая бегония.	Бегония прижилась

Заключение. Таким образом, в ходе проведения экспериментальных исследований было определено, что на устойчивость замкнутых экосистем влияют предпочтения растений к определенному режиму влажности, необходимому в естественных условиях. Наиболее сложно к условиям среды замкнутой экосистемы приспосабливаются гигрофиты, если во флорариуме нет других растений. Оптимальным объемом воды для создания флорариума 10-50 мл. Установлено, что при заселении флорариума несколькими видами растений, часть растений погибают в ходе межвидовой конкуренции. В замкнутой экосистеме создаются условия подходящие для жизни некоторых животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А.С. Керженцев. Искусственная замкнутая экосистема как экспериментальная база функциональной экологии [Текст] / А.С. Керженцев Российская Академия Наук. - Москва 2014. - Том 84, № 11, С. 1039–1041.
2. Перепелова. О.В. Флорариум. Тропические растения дома [Текст] / Перепелова О.В. – Москва: профиздат, 2009.
3. Зальцер Эрнст. Гидропоника для любителей [Текст] / Зальцер Эрнст. – Москва: изд-во «Колос», 1965.

**ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В КОМБИНАЦИИ С
ИНГИБИТОРАМИ REDD1 НА МОДЕЛИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМЫ *IN VITRO***

Е.С. Лылова, Е.А. Лесовая

Научный руководитель: к.б.н. Е.А. Лесовая

ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России,

Россия, г. Москва, Каширское ш, 24 стр. 15, 115478

E-mail: e.s.lylova@gmail.com

**ANTI-CANCER EFFECT OF COMBINATION OF GLUCOCORTICOIDS AND REDD1 INHIBITORS
BLOOD CANCER CELLS *IN VITRO***

E.S. Lylova, E.A. Lesovaya

Scientific Supervisor: PhD. E.A. Lesovaya

N.N. Blokhin NMRCO, Russia, Moscow, Kashirskoe sh. 24-15, 115478

E-mail: e.s.lylova@gmail.com

Abstract. *Glucocorticoids (GC) are widely used in the treatment of hematologic malignancies. However, their use is associated with the development of GC resistance and severe side effects, such as muscle and skin atrophy, osteoporosis, hyperglycemia. Biological response to GCs is mediated by glucocorticoid receptor (GR) regulating gene expression via DNA-dependent transactivation (TA) and transrepression (TR), negative interaction between GR and transcription factors. TR mediates anticancer effects of GR, while side effects are associated with GR TA. It was recently demonstrated that REDD1 (regulated in development and DNA damage 1), negative regulator of mTOR signaling, induced by GC in malignant lymphocytes, act as central drivers of GC-related adverse effects. Thus, we assumed that REDD1 inhibitors could be the protectors from GC-induced side effects during blood cancer chemotherapy. Using drug repurposing approach, we screened LINCS library to identify potential inhibitors of REDD1. Bioinformatics analysis identified emetin, an antiprotozoal agent, and CGP-60474, an inhibitor of protein kinase C as pharmacological REDD1 repressors. Both compounds indeed blocked basal and GC-induced REDD1 expression in leukemia CEM cells and lymphoma Granta cells. Combination of both REDD1 inhibitors with GC demonstrated synergetic cytotoxic effect on leukemia and lymphoma cells, which was in accordance of apoptosis induction. Moreover, it was shown that emetin and CGP-60474 diminished the expression of the GC-dependent genes GILZ and FKBP51 associated with GR TA. Coincidentally GR TR was enhanced after the treatment of cells by REDD1 inhibitors. Overall, our data built a strong foundation for development of safer GR-targeted therapies for hematologic malignancies.*

Введение. Глюкокортикоиды (GC) широко применяются в терапии злокачественных новообразований кроветворной системы. Однако их использование сопряжено с развитием побочных эффектов, таких как диабет, остеопороз и др. Биологический эффект GC реализуется посредством активации глюкокортикоидного рецептора (GR), регулирующего экспрессию генов путем транс-активации, требующей связывания GR с ДНК, и транс-репрессии – белок-белкового взаимодействия GR с факторами транскрипции [1]. Транс-репрессия обуславливает терапевтические эффекты GC, в то время

как транс-активация связана с побочными эффектами. Ключевую роль в развитии побочных эффектов GC играет REDD1 (regulated in development and DNA damage 1), ингибитор белкового комплекса mTORC1 [2]. Поиск ингибиторов *REDD1* является перспективным направлением исследований. С помощью биоинформатического скрининга базы данных LINCS были отобраны потенциальные ингибиторы гена *REDD1*: антипротозойное средство эметин и ингибитор протеинкиназы C CGP-60474. Целью работы является изучение влияния потенциальных ингибиторов REDD1 на экспрессию данного гена, на молекулярные механизмы функционирования GR и на противоопухолевое действие GC на моделях лейкозов и лимфом *in vitro*.

Экспериментальная часть. В качестве модели использовали клеточные линии лимфомы Granta и лейкоза СЕМ. Клетки культивировали в среде RPMI-1640, обрабатывали растворителем, эметином (1 мкМ), CGP-60474 (1 мкМ) в течение 6 ч, далее в среду добавляли растворитель или дексаметазон (Dex, 10 нМ) и культивировали в течение 24 ч. Цитотоксический эффект определяли методом подсчета клеток в камере Горяева. Индукцию апоптоза оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием окраски йодидом пропидия и методом Вестерн-блоттинга по расщеплению белка PARP. Уровень экспрессии гена *REDD1*, *GILZ*, *FKBP51*, *CCND2* и *ALOX5AP* определяли с помощью количественной PCR.

Результаты. Оба ингибитора снижают базальный и Dex-индуцированный уровень экспрессии гена *REDD1* в клетках обеих линий. Для линии Granta при обработке CGP-60474 отмечено снижение GC-индуцированного уровня экспрессии генов *GILZ* и *FKBP51*, ассоциированных с TA GR. При обработке эметином подобного эффекта не наблюдали. Снижение экспрессии маркера TR, *ALOX5AP*, отмечали как при обработке CGP-60474, так и в случае эметина, однако в случае эметина эффект был менее выражен. В клетках линии СЕМ под воздействием ингибиторов *REDD1* было показано снижение экспрессии гена *CCND2*, ассоциированного с TR GR. При оценке степени запуска TA GR отмечали снижение GC-индуцированного уровня экспрессии *GILZ* и *FKBP51* при обработке эметином, и *FKBP51* при обработке CGP-60474 (Табл. 1).

Таблица 1

Относительная экспрессия генов, ассоциированных с TA и TR GR после обработки ингибиторами *REDD1* и их комбинацией с Dex

	Ген	Ctrl	Dex	Em	Em+Dex	CGP	CGP+Dex
Granta	<i>REDD1</i>	1	1,90	0,48	0,67	0,30	0,41
	<i>GILZ</i>	1	6,24	1,80	9,39	1,60	2,02
	<i>FKBP51</i>	1	2,39	1,57	2,72	1,04	1,08
	<i>ALOX5AP</i>	1	0,85	0,73	0,74	0,32	0,21
СЕМ	<i>REDD1</i>	1	3,73	0,07	0,03	0,01	0,01
	<i>GILZ</i>	1	8,87	4,74	7,54	1,41	12,88
	<i>FKBP51</i>	1	1,23	1,17	0,38	0,76	0,15
	<i>CCND2</i>	1	1,18	0,10	0,14	0,10	0,07

Кооперативный цитотоксический эффект с Dex был показан для обоих соединений на обеих клеточных линиях. При анализе индукции апоптоза с помощью проточной цитофлуориметрии для линии СЕМ было продемонстрировано незначительное увеличение числа клеток в SubG1-фазе при обработке CGP-60474 и его комбинацией с Dex. Для линии Granta увеличение числа клеток в SubG1 фазе было

получено как при обработке индивидуальными ингибиторами, так и совместно с дексаметазоном (Рис. 1). Полученные результаты согласуются с данными, полученными при анализе расщепления белка PARP (Рис. 2).

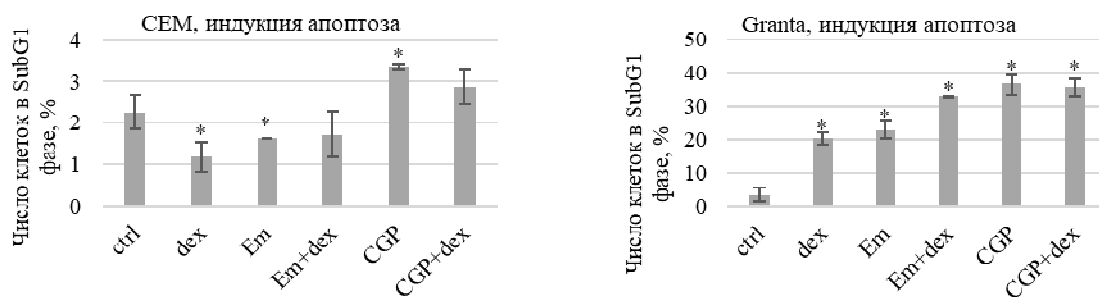


Рис. 1. Количество клеток в SubG1 фазе после обработки ингибиторами REDD1 и их комбинацией с Dex

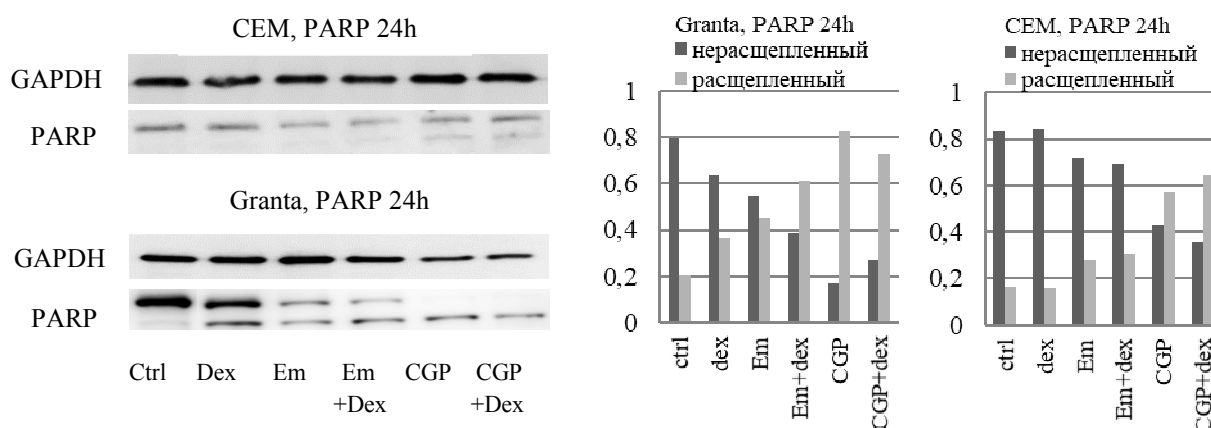


Рис. 2. Изменение экспрессии белка PARP после обработки ингибиторами REDD1 и их комбинацией с Dex

Закключение. Было показано, что эметин и CGP-60474 являются ингибиторами REDD1, а также подавляют GR-зависимую ТА. Совместно с кооперативным проапоптотическим и антипролиферативным эффектом комбинации данных препаратов с Dex, полученные данные демонстрируют перспективность данных исследований для разработки более эффективных протоколов химиотерапии гемобластозов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 17-75-20124

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Bosscher K., Beck I.M., Haegeman G. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system? // Brain Behav. Immun. – 2010. – Vol. 24, № 7. – P. 1035-1042.
2. Brugarolas J, Lei K, Hurley R.L, Manning B.D, Reiling J.H, Hafen E, Witters L.A, Ellisen L.W, Kaelin W.G.Jr. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex // Genes Dev. – 2004. – Vol. 18, № 23. – P. 2893-2904.

**ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ НАНОКРЕМНИЕМ НА
УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К БОЛЕЗНЯМ И КАЧЕСТВО ЗЕРНА**Б.И. Макаров

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

Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и торфа - филиал СФНЦА РАН,

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

E-mail: makar189@mail.ru**INFLUENCE OF COLLOID SOLUTION OF SILICON ON
MORPHOMETRIC PARAMETERS OF WHEAT**B.I. Makarov

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

Siberian Research Institute of Agriculture and Peat – branch of the Siberian Federal Scientific Center of Agro-

Bio Technologies of the Russian Academy of Sciences, Russian, Tomsk, Gagarina str., 3, 634050

E-mail: makar189@mail.ru

Abstract. *The present work is focused on the study the influence of presowing treatment by SiO₂ nanoparticles with their different concentration (3×10^{-4} , 1.5×10^{-4} and $0,3 \times 10^{-4}$) on the Irene spring wheat seeds. The small-field experiment was carry out under the natural agroclimatic conditions of the subtaiga zone Tomsk region. The increase in yield and increase in plant resistance to diseases (root rot) has been shown. There is a tendency to the removal and accumulation of nutrients.*

Введение. В настоящее время одним из перспективных направлений исследований является применение препаратов на основе наноматериалов в растениеводстве для повышения урожайности и качества сельскохозяйственных культур. К числу основных факторов повышения урожайности и качества сельскохозяйственных культур относятся биологически активные вещества, стимулирующие рост и развитие растений. К таким биологически активным веществам относятся биогенные элементы в коллоидном состоянии (наночастицы), в том числе нанокремний.

Кремний – один из самых распространенных в природе элементов, его кларковое содержание равно 27,6% по массе [1] по распространённости в земной коре кремний занимает второе место после кислорода. Основатель современной органической химии Ю. Либих, отмечал особое значение кремния в биоценозе в своем труде «Химия в приложении к земледелию» Ю. Либих указывал на четыре основах макроэлемента – азот, фосфор, калий и кремний, хотя до сих пор ведутся споры относительно роли кремния в росте и развитие растений.

Целью полевого эксперимента было изучение влияния наноразмерного кремния на устойчивость растений пшеницы к болезням, содержание белка в зерне и элементный состав зерна и стебля растений. В эксперименте нанокремний применяли в концентрациях, оказавшихся наиболее эффективными в предыдущих полевых опытах [2].

Экспериментальная часть. Объектом исследования являлась яровая пшеница сорта Ирень, которая проходила предпосевную обработку раствором наночастиц SiO₂ и выращивалась в естественных

агроклиматических условиях Томской области, на метровках по общепринятой методике [3] при систематическом распределении вариантов в 3-х повторениях. Отбор образцов растений на качественный анализ, а также учет урожайности проводился в конце вегетации.

За сутки перед посевом семена обрабатывали путем опрыскивания раствором наночастиц SiO₂ в концентрациях 3,0×10⁻⁴, 1,5×10⁻⁴ и 0,3×10⁻⁴, контрольные семена обрабатывали дистиллированной водой. Эксперимент проводили на полевом стационаре ФГБНУ СибНИИСХиТ - филиал СФНЦА РАН на серой лесной оподзоленной почве с pH-5,1 и содержанием гумуса 6,5%. В эксперименте использовали наночастицы SiO₂ полученные методом импульсной лазерной абляции излучением ИК лазера наносекундной длительности импульсов мишени монокристаллического кремния в дистиллированной воде средний размер частиц – 7 нм, массовая концентрация частиц в растворе составляла 30 мг/л [4].

Содержание белка определяли в сертифицированном (№ 0081/203) Лабораторно-аналитическом центре СибНИИСХиТ - филиала СФНЦ РАН согласно [5]. Распространенность болезней и индекс развития болезней учитывали в соответствии с рекомендациями [6]. Элементный состав зерна и стебля растения определяли методом рентгенофлуоресцентного анализа на приборе Shimadzu XRF-1800. Мощность рентгеновского излучения 4 кВт, диаметр диафрагмы – 10 мм. Предварительно образцы измельчали и запрессовывали в таблетку массой 3,5 г.

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

Результаты. Результаты полевого эксперимента показали, что предпосевная обработка семян пшеницы нанокремнием способствует 20,1 и 18,4%-му увеличению сбора зерна пшеницы с единицы площади. Максимальную прибавку урожайности обеспечило применение 0,3×10⁻⁴% концентрации. Предпосевная обработка семян нанокремнием во всех использованных концентрациях привела к уменьшению распространенности корневых гнилей на 16 – 33%, а индекса развития болезни на 7 – 14% (табл. 1). Кроме того, предпосевная обработка также оказала положительное влияние на увеличение содержания в зерне пшеницы сырого протеина (табл. 1).

Таблица 1

Влияние предпосевной обработки семян пшеницы на пораженность растений корневыми гнилями, урожайность и качество зерна

Вариант	Масса зерна, гр./м ²	Сырой протеин, %	Распространенность болезни, %	Индекс развития болезни, %
Контроль	136,2 ± 3,1	11,34	77	29
SiO ₂ 3,0 × 10 ⁻⁴ %	142,1 ± 5,3	11,41	61	22
SiO ₂ 1,5 × 10 ⁻⁴ %;	161,3 ± 4,4*	11,56	44	15
SiO ₂ 0,3 × 10 ⁻⁴ %	163,7 ± 2,9*	11,43	52	16

Кроме того предпосевная обработка семян нанокремнием способствовала увеличению выноса растениями из почвы и аккумуляции в стеблях таких важных биогенных элементов, как кальций, фосфор, магний и железо. В меньшей степени обработка также способствовала накоплению некоторых биогенных элементов (фосфор, калий, магний, кальций и кремний) в зерне (табл. 2)

Таблица 2

Влияние предпосевной обработки семян пшеницы на содержание элементов в зерне, %

Элемент	Контроль		SiO ₂ 3,0×10 ⁻⁴ %		SiO ₂ 1,5×10 ⁻⁴ %		SiO ₂ 0,3×10 ⁻⁴ %	
	Зерно	Стебель	Зерно	Стебель	Зерно	Стебель	Зерно	Стебель
C	54,1101	59,9711	55,1642	60,3729	56,4252	58,1719	54,6787	60,2263
O	35,0539	32,6788	34,8735	32,5176	33,1435	34,7855	35,7984	32,4470
N	8,7387	–	7,7557	–	8,0277	–	7,4636	–
K	0,8751	2,5357	0,8921	2,5549	0,9627	2,3946	0,8499	2,4225
P	0,5423	0,1453	0,5561	0,1569	0,6362	0,1795	0,5450	0,1769
S	0,2566	0,1973	0,2689	0,2179	0,2825	0,2114	0,2425	0,2027
Mg	0,1688	0,1262	0,1644	0,1434	0,1832	0,1513	0,1622	0,1481
Cl	0,0967	0,0534	0,0939	0,0539	0,1082	0,0394	0,0811	0,0366
Ca	0,0688	0,2901	0,0920	0,3264	0,0769	0,3254	0,0652	0,3342
Si	0,0331	3,7053	0,0537	3,3577	0,0560	3,4453	0,0380	3,5687
Al	0,0306	0,1474	0,0510	0,1354	0,0555	0,1241	0,0418	0,2253
Fe	0,0133	0,0490	0,0130	0,0608	0,0146	0,0594	0,0130	0,0809
Zn	0,0060	0,0097	0,0056	0,0055	0,0069	0,0051	0,0062	0,0059
Br	0,0059	0,0086	0,0079	0,0066	0,0080	0,0061	0,0065	0,0050
Mn	-	0,0080	0,0081	0,0042	0,0078	0,0054	0,0078	0,0094

Закключение. Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что предпосевная обработка семян яровой пшеницы сорта Ирень наночастицами SiO₂ в различных концентрациях способствует значительному увеличению урожайности и повышает устойчивость растений к болезням (корневым гнилям). При этом по большинству параметров наиболее эффективными оказались минимальная и средняя концентрации нанокремния, что подтверждает результаты предыдущих экспериментов. Предпосевная обработка семян нанокремнием в минимальной (0,3×10⁻⁴%) и средней (1,5×10⁻⁴%) концентрациях способствовала соответственно 20,1 и 18,4%-му увеличению сбора зерна пшеницы с единицы площади. Отмечается тенденция к выносу и накоплению биогенных элементов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виноградов, А. П.: «Закономерности распределения химических элементов в земной коре». Геохимия, 1956, № 1, С. 6-52.
2. Tereshchenko N.N., Zmeeva O.N., Makarov B.I., Kravets A.V., Svetlichny V.G., Lapin I. V., The Influence of Silicon Oxide Nanoparticles on Morphometric Parameters of Monocotyledons and Dicotyledons in Soil and Climatic Conditions of Western Siberia, as well as on Microbiological Soil Properties // BioNanoScience. 2017. № 7. С. 703-711. DOI 10.1007/s12668-017-0419-x
3. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Под ред. Доспехов Б.А. - М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
4. Svetlichnyi, V.A., Izaak, T.I., Lapin, I.N., Martynova, D.O., Stonkus, O.A., Stadnichenko, A.I., Boronin, A.I. Physicochemical investigation of nanopowders prepared by laser ablation of crystalline silicon in water.// Advanced Powder Technology. 2015. № 26. С. 478–486.
5. ГОСТ 13496.4-93 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания азота и сырого протеина.
6. Чулкина В.А., Коняева Т.Т., Кузнецова Т.Т. Борьба с болезнями сельскохозяйственных культур в Сибири. М.: Россельхозиздат, 1987. – 253с.

**СОСТОЯНИЕ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ ПОЛУЧАЮЩИХ
АНТИПСИХОТИЧЕСКУЮ ТЕРАПИЮ**

И.А. Меднова, А.С. Бойко, В.В. Дубровская

Научные руководители: профессор, д.м.н. С.А. Иванова, д.м.н. Е.Г. Корнетова

Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук,
Россия, г. Томск, ул. Алеутская, 4, 634027
E-mail: i.mednova@yandex.ru

**LIPID METABOLISM IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA RECEIVING ANTIPSYCHOTIC
THERAPY**

I.A. Mednova, A.S. Boiko, V.V. Dubrovskaya

Scientific Supervisors: Prof., Dr. S.A. Ivanova, E.G. Kornetova

Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of
Sciences, Russia, Tomsk, Aleutskaya str., 4, 634027
E-mail: i.mednova@yandex.ru

***Abstract.** This study investigated lipid metabolism in 94 patients with schizophrenia, receiving antipsychotic therapy, compared with 43 healthy people. Increased triglyceride level ($p=0,040$) and decreased high-density lipoproteins ($p<0,001$) and apolipoproteins A1 ($p=0,002$) levels in serum of patients with schizophrenia were shown. The identified alteration in the lipid spectrum increase the risk of cardiovascular disease and atherosclerosis in patients with schizophrenia.*

Введение. Шизофрения относится к социально значимым заболеваниям с неустановленной этиологией и патогенезом, часто приводит к нетрудоспособности больных, что определяет высокие затраты общества не только на её непосредственное лечение, но и на социальную поддержку и реабилитацию [1]. У пациентов с психическими заболеваниями частота развития метаболических нарушений в два раза выше, чем в общей популяции, что связывают с малоподвижным образом жизни пациента, социально-демографическими факторами и побочными эффектами антипсихотических препаратов [2]. К особенностям метаболических нарушений у больных шизофренией относят высокую частоту абдоминального ожирения, инсулинорезистентность, триглицеридемию и снижение липопротеидов высокой плотности на фоне малой распространенности общего ожирения, и гипергликемии [3]. Снижение концентрации липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и гипертриглицеридемия наиболее широко распространены у больных шизофренией [4]. Аполипопротеины (АпоЛП) входят в состав маромолекулярных комплексов липопротеидов, выполняя в организме транспортную и рецепторную функции. Был выявлен дисбаланс аполипопротеинов ApoA1, ApoA4, ApoC3, ApoB, ApoE, в сыворотке крови больных шизофренией, что позволяет рассматривать их в качестве специфического маркера заболеваний шизофренического спектра [5].

Исходя из выше сказанного, представляется актуальным комплексный подход в изучении состояния липидного обмена у больных шизофренией.

Цель исследования. Изучить состояние липидного обмена у больных шизофренией получающих антипсихотическую терапию

Материалы и методы исследования. Было проведено комплексное клиническое и лабораторное обследование 94 больных шизофренией (F20 согласно МКБ-10), проходящих лечение в отделении эндогенных расстройств НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Группу контроля составили 43 психически и соматически условно здоровых лиц, соответствующих по полу и возрасту. В качестве материала исследования использовалась сыворотка крови. Определение концентрации холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ) и ЛПВП в сыворотке крови проводилось колориметрическими, энзиматическими методами с использованием коммерческих наборов (Cotman, Польша). Концентрацию липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) рассчитывали по формуле Фридвальда: ЛПНП (ммоль/л) = общий ХС – ЛПВП – ТГ/2,2. Концентрация аполипопротеинов определялась на мультиплексном анализаторе MAGPIX (Luminex, USA) с применением xMAP® Technology с использованием панели APOMAG-62K производства MILLIPLEX® MAP (Merck, Darmstadt, Germany) согласно инструкции к набору. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета стандартных прикладных программ SPSS Statistic 17 для Windows. Выборки проверяли на нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка. Значимость различий определяли по t-критерию Стьюдента при нормальном распределении. Для независимых выборок при распределении, отличающемся от нормального, значимость определяли по U-критерию Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. При анализе липидного спектра больных шизофренией было выявлено значимое повышение уровня триглицеридов ($p=0,040$), а также понижение концентрации липопротеинов высокой плотности ($p<0,001$) в сыворотке крови больных лиц по сравнению с показателями в контрольной группе (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация общего холестерина, триглицеридов, липопротеинов высокой и низкой плотности (ммоль/л) в сыворотке крови больных шизофренией и здоровых лиц (Me[Q1;Q3]) (M±SD)

	Здоровые лица N=43	Пациенты N=94	p-value
Общий холестерин, ммоль/л	4,5 [3,4; 5,1]	4,4 [3,8; 5,2]	0,461
ТГ, ммоль/л	1,2 [1;1,3]	1,4 [0,9;1,9]	0,040*
ЛПВП, ммоль/л	1,5±0,26	1,11± 0,31	0,000*
ЛПНП, ммоль/л	2,6± 0,9	2,2±0,8	0,078

Примечание: p – уровень статистической значимости различий при сравнении показателей больных шизофренией и здоровых лиц.

Анализ спектра аполипопротеинов показал значительное снижение концентрации ApoA1 ($p=0,002$) у пациентов с шизофренией по сравнению со здоровыми субъектами. В отношении остальных проанализированных аполипопротеинов статистически значимых различий установлено не было (табл. 2).

Таблица 2

Концентрация аполипротеинов (мкг/дл) в сыворотке крови больных шизофренией
и здоровых лиц (Me [Q1;Q3])

	Здоровые лица N=25	Пациенты N=53	p-value
АпоА1, мкг/дл	117.69 [48.81; 190.17]	51.95 [39.53; 66.68]	0.002*
АпоС2, мкг/дл	13.75 [10.89; 25.36]	20.17 [9.43; 36.3]	0.268
АпоС3, мкг/дл	31.66 [23.16; 41.49]	42.55 [20.865; 67.59]	0.216
АпоЕ, мкг/дл	4.655 [3.21; 6.12]	4.6 [3.59; 5.87]	0.911

Примечание: p – уровень статистической значимости различий при сравнении показателей больных шизофренией и здоровых лиц.

Заключение. В результате проведенных исследований были выявлены нарушения в липидном спектре сыворотки крови больных шизофренией. Так сыворотка крови больных шизофренией отличается повышенной атерогенностью, за счет увеличения фракций ТГ, снижения ЛПВП и снижение содержания АпоА1. Выявленные нарушения повышают риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и атеросклероза у больных шизофренией, а также ухудшают течение основного заболевания.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 18-15-00011 «Шизофрения, сочетанная с метаболическим синдромом: клинико-конституциональные факторы и молекулярные маркеры».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семке А.В., Ветлугина Т.П., Иванова С.А., Рахмазова Л.Д., Гуткевич Е.В., Лобачева О.А., Корнетова Е.Г. Биопсихосоциальные основы и адаптационно-компенсаторные механизмы шизофрении в регионе Сибири // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2009. – Т. 5, № 56. – С. 15–20.
2. Алфимов П.В. и др. Метаболический синдром у больных шизофренией (обзор литературы) // Современная терапия психических расстройств. – 2014. – № 3. – С. 8-14.
3. Незнанов Н.Г., Мартынихин И.А., Тянянский Д.А., Ротарь О.П., Солнцев В.Н., Соколян Н.А., Конради А.О., Денисенко А.Д. Шизофрения – фактор, увеличивающий риск развития метаболического синдрома. Результаты исследования с использованием метода подбора пар // Медицинский академический журнал. – 2013. – Т. 13, № 3. – С. 90–96.
4. Корнетова Е.Г., Меднова И.А., Дубровская В.В., Бойко А.С., Иванова С.А., Семке А.В. Метаболический синдром у больных шизофренией в психиатрической практике: пособие для врачей. – Томск, 2018. – 32с.
5. Alekseeva I.V. et al. A distinct serum protein pattern in patients with paranoid schizophrenia // Physiology and Pharmacology. – 2017. – vol. 21, №. 4. – P. 304-311.

**НАСЛЕДСТВЕННЫЙ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, АССОЦИИРОВАННЫЙ С МУТАЦИЕЙ
ГЕНА *MUTYH* У ПАЦИЕНТКИ БУРЯТСКОЙ НАЦИОНАЛЬНОСТИ**

А.Ю. Молоков¹, П.А. Гервас², Е.В. Денисов²

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Н.В. Чердынцева

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

²НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН,

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

E-mail: amolokov@inbox.ru

**NEW GERMLINE *MUTYH* GENE VARIANT IN THE BURYAT MONGOL BREAST CANCER
PATIENT**

A.Yu. Molokov¹, P.A. Gervas², E.V. Denisov²

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

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

²Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science,

Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634050

E-mail: amolokov@inbox.ru

Abstract. *To date, there are no reports on inherited gene mutations associated with breast cancer among Mongoloid indigenous people in Russia. This study aimed to identify the mutations that are related to the occurrence of hereditary breast cancer in the six Mongoloid indigenous groups in Russia: South Siberia (Khakas), West Siberia (Altaians), East Siberia (Evenks, Buryats, Tyvans) and Far East Russia (Yakuts). Genomic DNA isolated from blood samples was used to prepare libraries using a capture-based target enrichment kit Hereditary Cancer Solution™ (SOPHiA GENETICS, Switzerland). Next generation sequencing (NGS) was performed on an Illumina NextSeq500 System (Illumina, USA). In our study, we found 1 new sequence variant and 1 Indel in addition to 11 SNVs that passed filters during variant calling. We identified a probably damaging germline variant in the *MUTYH* gene (rs35352891) in one Buryat Mongol breast cancer patient aged 50. To the best of our knowledge, this report is the first to describe rs35352891 in the *MUTYH* gene in Buryat patient with breast cancer who had a family history of disease. Further research is warranted to confirm the impact of the rs35352891 variant on the risk of breast cancer in the Buryat Mongol population.*

Введение. В мире ежегодно регистрируется более 1 миллиона случаев рака молочной железы (РМЖ), а в РФ – свыше 50 тысяч. В 5–10% случаев РМЖ обусловлен наследственным синдромом РМЖ и накоплением в семьях мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2*, фатально увеличивающих риск возникновения данной патологии до 85–100%. Для населения России славянского происхождения была выявлена мутация-основатель (от англ. founder) 5382insC, которая составляет до 90% всех мутаций гена *BRCA1* у пациенток РМЖ, проживающих в достаточно отдалённых друг от друга регионах России [1, 2]. На сегодняшний день не найдено наследственных мутаций генов *BRCA1/2* у коренных народов России, принадлежащих к монголоидной расе [3]. Данное исследование было направлено на выявление мутаций

генов, связанных с возникновением наследственного РМЖ у коренных народов России: Южной Сибири (хакасы), Западной Сибири (алтайцы), Восточной Сибири (эвенки, буряты, тувинцы) и Дальнем Востоке (якуты) России.

Экспериментальная часть. В исследование было включено 16 пациентов с признаками наследственного РМЖ монголоидного происхождения (хакасы, алтайцы, эвенки, буряты, тувинцы, якуты). Средний возраст пациенток с диагнозом РМЖ составил 48 лет. Одним из основных критериев исключения пациентов было наличие РМЖ-ассоциированных мутаций генов *BRCA1/2* (*BRCA1* 5382insC, 185delAG, 4153delAG, T300G, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 2080delA и *BRCA2* 6174delT).

Образцы крови собирали в пробирки, содержащие ЭДТА. Геномную ДНК выделяли методом фенол/хлороформной экстракции. Качество ДНК оценивали с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit® (ThermoFisher Scientific, США). Целостность ДНК (DIN) проверяли с использованием системы Agilent 2200 TapeStation. Подготовка библиотек проводилась с использованием набора Hereditary Cancer Solution™ (SOPHiA GENETICS) с целью обогащения 27 генов (*ATM*, *APC*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EPCAM*, *FAM175A*, *MLH1*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PIK3CA*, *PMS2*, *PMS2CL*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53* и *XRCC2*). Секвенирование выполнялось на платформе NextSeq500 (Illumina, США). Анализ результатов был выполнен с использованием программного обеспечения SOPHiA DDM (SOPHiA GENETICS, Швейцария).

Результаты. По анализу данных NGS среди 16 неродственных пациентов с признаками наследственного РМЖ монголоидного происхождения мы обнаружили 11 SNVs, 1 Indel и 1 ранее не описанный вариант в базах dbSNP и др.

В нашем исследовании у пациентки 50 лет бурятской национальности с диагнозом инвазивная протоковая карцинома молочной железы (T₂N₀M₀) с отягощенным наследственным анамнезом (мать – колоректальный рак, бабушка – рак яичников, тетя – РМЖ) была обнаружена миссенс-мутация с.1118C>T (rs35352891) гена *MUTYH*, приводящая к замене аланина на валин. Учитывая, что диагноз РМЖ пациентке был поставлен после 40 лет и отягощенный семейный анамнез, данный аллельный вариант гена *MUTYH* может являться РМЖ-ассоциированным. По данным ClinVar клиническая значимость описанного нами аллельного варианта носит противоречивый характер [4-7], тогда как согласно PolyPhen-2 с.1118C>T является «вероятно патогенным». Ген *MUTYH* (mutY ДНК гликозилаза) располагается на первой хромосоме на участке 1p34.1, включает 16 экзонов и кодирует белок эксцизионной репарации ДНК, участвующий в восстановлении окислительного повреждения гуанина [8]. Ген *MUTYH* относится к группе генов, ассоциированных с наследственными онкосиндромами [9]. Описана взаимосвязь rs35352891 гена *MUTYH* с колоректальным раком, семейным полипозом у корейцев и японцев [4, 6, 7, 9-11].

Заключение. Нами впервые идентифицирован полиморфный вариант с.1118C>T (rs35352891) гена *MUTYH* у пациентки бурятской национальности с РМЖ и отягощенным семейным анамнезом. Данный вариант может быть ассоциирован с риском развития РМЖ. Дальнейшие исследования должны быть направлены на изучение частоты встречаемости rs35352891 у пациенток с отягощенной семейной историей по РМЖ/раку яичников и здоровых добровольцев.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18–29–09046.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. – 2010. – Т. 11., № 4. – С. 258–266.
2. Любченко Л.Н., Поспехова Н.И., Пароконная А.А., и др. Рак молочной железы и/или яичников в составе наследственного онкологического синдрома // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2009. – Т. 1–2. – С. 59–63.
3. Cherdyntseva N., Gervas P., Voropaeva E., et al. (2017). New variants in the BRCA1 gene in Buryat Mongol breast cancer patients: Report from two families. *Cancer Biomarkers*, no. 3, pp. 291–296.
4. Nielsen M., Lynch H., Infante E., et al. MUTYH –Associated Polyposis. (n.d.). Retrieved January 18, 2019, from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK107219/>
5. Goto M., Shinmura K., Nakabeppu Y., et al. (2010). Adenine DNA Glycosylase Activity of 14 Human MutY Homolog (MUTYH) Variant Proteins Found in Patients with Colorectal Polyposis and Cancer. *Human Mutation*, no. 11, pp. 1861–1874.
6. Abduljaleel Z., Vazquez J.R. Gorodkin J. Association of Functional Variants and Protein-to-Protein Physical Interactions of Human MutY homolog linked with Familial Adenomatous Polyposis and colorectal cancer Syndrome. (n.d.). Retrieved February 22, 2019, from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/552943v2/>
7. Shinmura K., Goto M., Tao H., et al. (2014). Impaired 8 – Hydroxyguanine Repair Activity of MUTYH Variant p.Arg109Trp Found in a Japanese Patient with Early –Onset Colorectal Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, no. 617351.
8. Цуканов А.С., Шубин В.П., Кузьминов А.М., и др. Дифференциальный диагноз MutYH-ассоциированного полипоза и спорадических полипов толстой кишки // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. –2018. – Т. 28., № 6. – С. 51–57.
9. Kim D.W., Kim I.J., Kang H.C., et al. (2007). Germline mutations of the MYH gene in Korean patients with multiple colorectal adenomas. *International Journal of Colorectal Disease*, no. 10, pp. 1173–1178.
10. Yanaru-Fujisawa R., Matsumoto T., Ushijima Y., et al. (2008). Genomic and functional analyses of MUTYH in Japanese patients with adenomatous polyposis. *Clinical Genetics*, no. 6, pp. 545–553.
11. Kim J.C., Ka I.H., Lee Y.M., et al. (2007). MYH, OGG1, MTH1, and APC alterations involved in the colorectal tumorigenesis of Korean patients with multiple adenomas. *Virchows Archiv*, no. 3, pp. 311–319.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRE/LOXP ДЛЯ ИНДУКЦИИ МНОЖЕСТВЕННЫХ
ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ГЕНОМЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

Р.В. Мунгалов

Научный руководитель: к.б.н., внс, В.С. Фишман
Новосибирский государственный университет, НГУ,
Россия, Новосибирск, Пирогова, 2, 630090
ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН,
Россия, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, 630090
E-mail: mungalov.roman@yandex.ru

**APPLICATION OF CRE/LOXP SYSTEM FOR INDUCTION OF MULTIPLE CHROMOSOMAL
ABERRATIONS IN THE HUMAN GENOME**

R.V. Mungalov

Scientific Supervisor: V.S. Fishman, PhD, Group Leader
Novosibirsk State University, NSU, Russia, Novosibirsk, Pirogova Street, 2, 630090
ICG SB RAS, Russia, Novosibirsk, Ac. Lavrentieva ave., 10, 630090
E-mail: mungalov.roman@yandex.ru

***Abstract.** In this research we have a goal to study an interplay between disturbances of three-dimensional human genome organization, induced by chromosomal aberrations, and gene expression and epigenetic modifications. Despite of different similar research, that use target genomic editing methods, like CRISPR/Cas9, we suggest an alternative way of the induced mutagenesis, namely Cre/LoxP system. It will allow us to create a big collection of chromosomal aberrations (up to 10 events per cell), in spite of unique events using CRISPR/Cas9. The analysis of just a few number of subclones, each of them will have about 10 aberrations, will allow us to get enough information about gene expression changes in different parts of human genome.*

Введение. Существует много разных вариантов генетических нарушений у живых организмов. Это в первую очередь мутации в самих генах, влияющие на структуру и функцию белка. Помимо этого, могут быть затронуты регуляторные элементы, что впоследствии может привести к изменениям в работе контролируемых ими генов – сайленсингу или оверэкспрессии, что изменит количество синтезируемого белка. Среди причин, влияющих на возникновение мутаций, можно выделить ошибки системы репарации, вирусы и другие инвазивные агенты, нарушение геномного импринтинга и другое. Всё это приводит к изменению паттерна экспрессии тех или иных генов. Однако одним из наиболее интересных и неочевидных факторов изменения генной экспрессии является нарушение трёхмерной организации самого генома [1].

В этом проекте мы разрабатываем новый подход к изучению роли трёхмерной архитектуры генома в нарушениях паттерна генной экспрессии, вызванных хромосомными перестройками в геноме клеток человека, – создание и анализ большой выборки хромосомных перестроек, индуцированных при помощи системы Cre/LoxP-рекомбинации [2]. Важным преимуществом выбранной системы является то,

что она позволит нам добиться по меньшей мере десятка перестроек на одну клетку, в отличие от уникальных событий на геном при использовании технологий геномного редактирования [3].

Экспериментальная часть. Для создания в геноме хромосомной перестройки с помощью системы Cre/LoxP, необходимы два LoxP-сайта – определённой 34-буквенной последовательности, имеющей направление, – а также белок сайт-специфической рекомбинации Cre-рекомбиназа. Белок распознаёт в геноме последовательности LoxP-сайтов и осуществляет рекомбинацию между ними, которая в зависимости от направления обоих LoxP-сайтов может быть делецией, инверсией или транслокацией.

Для введения LoxP-сайтов в геном клеток нами были собраны генетические векторы, несущие LoxP-сайт либо кодирующие Cre-рекомбиназу. На их основе были собраны псевдолентивирусные конструкции и отработана методика оценки количества провирусных интеграций на окологаплоидной линии клеток человека HAP-1 [4] при помощи количественной ПЦР. Учитывая окологаплоидный набор хромосом данной линии клеток, это составляет примерно одну вставку на две хромосомы. Таким образом, после экзогенной экспрессии Cre-рекомбиназы мы ожидаем более вероятного возникновения межхромосомных транслокаций, приводящих к крупным изменениям архитектуры хроматина. В нашем эксперименте важна плоидность экспериментальной линии клеток. Клетки должны быть около- или гаплоидными для чистоты эксперимента, чтобы в случае гетерозиготы те гомологи, в которых не произошла перестройка, не вносили свой вклад в паттерн геномной экспрессии. Мы также показали, что концентрирование лентивирусов путём их ультрацентрифугирования позволяет увеличить число провирусных интеграций как минимум на порядок.

Популяция клеток HAP-1 была инфицирована полученными на основе векторов с LoxP-сайтами лентивирусами. Далее мы субклонировали часть клеток из этой популяции и проанализировали их ПЦР в реальном времени на предмет наличия вирусных интеграций, а также для сравнения субклонов друг с другом. Субклоны с наибольшим числом интеграций (16-25 на геном) были отобраны для дальнейших исследований, а именно цитогенетического анализа и обработки Cre-рекомбиназой.

Результаты. Ниже приведены результаты ПЦР в реальном времени, демонстрирующие относительное, а также абсолютное число вирусных интеграций (вирус, несущий LoxP-сайт) (рис. 1). По оси *x* отложены образцы, по оси *y* – относительное количество интеграций вируса с LoxP-сайтом в долях единицы. Для оценки абсолютного числа копий LoxP-сайтов, встроенных в геном, нами была сконструирована контрольная плаزمида *pT_Ctrl_12* (последний столбец на гистограмме, значение которого равно 1), которая несла LoxP-сайт и эндогенный контроль для ПЦР в реальном времени в известном соотношении, равном 2 (в качестве эндогенного контроля был взят ген синапсина с известной копийностью в геноме человека, равной 1). Это означает, что плаزمида несёт в себе 2 копии LoxP-сайта на 1 копию эндогенного контроля. Таким образом, мы смогли оценить число интеграций вируса с LoxP-сайтом в каждом из субклонов. Для дальнейшего анализа были отобраны два субклона (30s и 35s), несущие в геноме наибольшее число копий LoxP-сайтов (примерно 16-25).

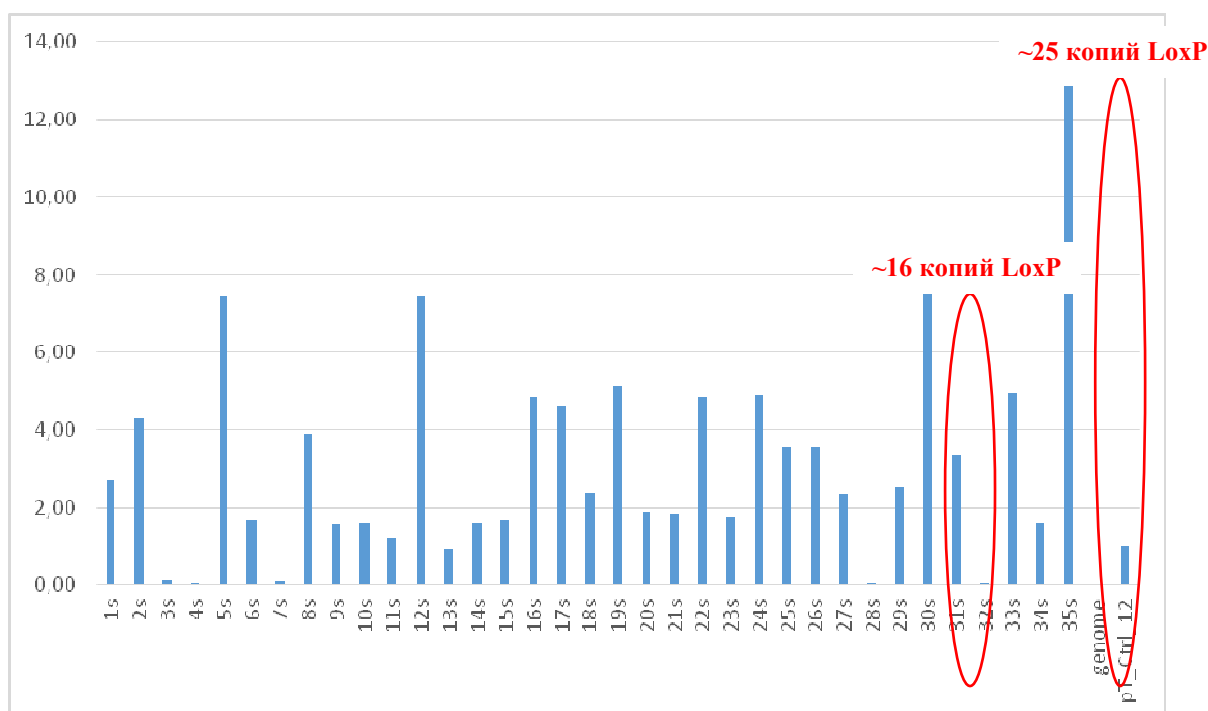


Рис. 1. Результаты ПЦР в реальном времени. Абсолютное число вирусных интеграций в проанализированных субклонах. За единицу принято число копий LoxP-сайтов в контрольной плазмиде pT_Ctrl_12, равное 2 (см. текст выше). Слева направо: 1s-35s – субклоны с разным количеством встраек вируса, несущего LoxP-сайт; геномная ДНК для отрицательного контроля (genome); контрольная плаزمида pT_Ctrl_12

Заключение. В дальнейшем из субклонов, в которых будет достигнуто желаемое количество событий рекомбинации (порядка 3-10 перестроек в различных районах генома), будут получены inverse-PCR библиотеки и проведено секвенирование для картирования индуцированных перестроек. Наиболее интересные с точки зрения локализации перестроек субклоны будут позже проанализированы такими методами, как Hi-C, RNA-Seq и ChiP-Seq.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rowley M.J. and Corces V.G. Organizational principles of 3D genome architecture // Nat. Rev. Genet. – 2018. – vol. 19. – P. 789–800.
2. Sauer B. and Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1 // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1988. – vol. 85, № 14. – P. 5166–5170.
3. Lupiáñez D. G. et al. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions // Cell. – 2015. – vol. 161, № 5. – P. 1012–1025.
4. Olbrich T., Mayor-Ruiz C., Vega-Sendino M. A p53-dependent response limits the viability of mammalian haploid cells // PNAS. – 2017. – vol. 114, № 35. – P. 9367-9372.

**МУТАЦИОННЫЙ ЛАНДШАФТ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С РАЗНЫМИ
ВАРИАНТАМИ ИНВАЗИВНОГО РОСТА**

Н.М. Новиков^{1,2}, С.Ю. Золотарёва¹, А.М. Киселёв³

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

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

²НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634050

³ФГБУ "НМИЦ им. В.А. Алмазова" Минздрава России, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2, 197341

E-mail: drcoxisefoxi@gmail.com

**MUTATION LANDSCAPE OF BREAST CANCERS WITH DIFFERENT PATTERNS OF THE
INVASIVE GROWTH**

N.M. Novikov^{1,2}, S.Y. Zolotaryova¹, A.M. Kiselev³

Scientific Supervisor: E.V. Denisov, PhD

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina Str. 36, 634050

²Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, Russia, Tomsk, Kooperativny Str. 5, 634050

³Almazov National Medical Research Centre, Russia, Saint-Petersburg, Akkuratov Str. 2, 197341

E-mail: drcoxisefoxi@gmail.com

***Abstract.** In the present study, we conducted whole exome sequencing of breast tumors with individual and collective cell invasion to identify genetic alterations, associated with specific types of cell movement. Using bioinformatic approaches, we characterized mutational landscapes, signaling pathways and genetic variants inherent in collective and individual types of invasion. Despite the absence of significant differences in mutational landscape, we found that breast tumors with collective and individual invasion differ from each other in the spectrum of alterations in the genes of cell migration.*

Введение. Инвазия – одна из характеристик опухолевого роста, проявляющаяся в миграции клеток опухоли из первичного очага в соседние ткани. Инвазия является первым этапом на пути процессе метастазирования онкологических заболеваний [1]. Понимание молекулярных основ движения опухолевых клеток представляет актуальную задачу в современной онкологии [2]. Несмотря на обилие литературных данных по этой проблеме, информация о генетических нарушениях, вовлеченных в коллективную или индивидуальную инвазию, отсутствует.

Рак молочной железы (РМЖ) характеризуется внутриопухолевой морфологической гетерогенностью, представленной наличием различных видов опухолевых (морфологических) структур: альвеолярных, солидных, тубулярных, трабекулярных и дискретных [3, 4]. В серии исследований было показано, что морфологические структуры являются отражением вариантов инвазивного роста и играют значительную роль в метастазировании РМЖ. Например, трабекулярные структуры имеют выраженный мезенхимальный фенотип, демонстрируют значительную ассоциацию с регуляцией сигнальных путей, вовлеченных в инвазию, и ассоциированы с высоким риском гематогенного метастазирования РМЖ [5, 6]. Всё это позволило нам заключить, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность РМЖ

представляет привлекательную модель для изучения молекулярных особенностей инвазивного роста, в частности различий в мутационном ландшафте опухолей молочной железы, демонстрирующих коллективную или индивидуальную инвазии.

Целью настоящего исследования был поиск генетических нарушений, ассоциированных с коллективным и индивидуальным вариантом инвазивного роста опухолей молочной железы.

Материалы и методы. В исследовании были использованы образцы опухолевой и нормальной ткани молочной железы, полученные в ходе хирургического вмешательства от пациентов с РМЖ (n=10). Вариант инвазивного компонента (коллективный или индивидуальный) определяли с помощью морфологического анализа. Из образцов опухолевой и нормальной ткани с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США) была выделена ДНК. Образцы ДНК использовали для подготовки экзомных библиотек (SureSelect XT HS, Agilent, США). Секвенирование проводили на платформе NextSeq500 в режиме PE75 (Illumina, США). Обработка данных проводилась с помощью пайплайна GATK, генетические варианты, обнаруженные в образцах опухолевой ткани относительно нормальной ткани молочной железы, аннотировали с помощью инструмента ANNOVAR. Количество общих и специфических генов, содержащих нарушения, для каждого типа опухолей подсчитывалось с помощью инструмента InteractiVenn [7]. Анализ сигнальных путей, затронутых генетическими нарушениями, проводился с использованием инструмента GSEA MSigDB [8]. В результате отбирались гены, нарушения в которых встречались только в опухолях с коллективной или индивидуальной инвазией, и проводился анализ литературных данных на предмет ассоциации этих генов с клеточной подвижностью и метастазированием.

Результаты. В результате исследования не было показано значительных различий в мутационном ландшафте опухолей с коллективной и индивидуальной инвазией. Существенных различий не было обнаружено как в общей мутационной нагрузке, так и на уровне частоты и типов нарушений в генах-драйверах канцерогенеза. Тем не менее, спектр мутантных генов отличался между опухолями с коллективной и индивидуальной инвазией. Так, при коллективной инвазии генетическими нарушениями были затронуты сигнальные пути, связанные с раком (Pathways in Cancer, 39 генов), сигнальный путь молекул клеточной адгезии (Cell Adhesion Molecules, CAMs, 18 генов), сигнальный путь WNT (WNT Signaling Pathway, 19 генов) и другие. В опухолях с индивидуальной инвазией был статистически значимо выражен путь фокальной адгезии (Focal Adhesion, 20 генов), сигнальный путь глиомы (Glioma, 10 генов) и другие. Кроме того, исследуемые типы опухолей молочной железы различались в спектре мутантных генов, вовлеченных по данным литературы в регуляцию клеточной подвижности и миграции. Так, в опухолях с коллективной инвазией чаще детектировались изменения в генах, связанных с активацией ГТФаз семейства Rho. Напротив, опухоли с индивидуальной миграцией чаще демонстрировали наличие нарушений в генах, белки которых вовлечены в инактивацию Rho ГТФаз. Интересно, что в отличие от опухолей с коллективной инвазией случаи с индивидуальным вариантом инвазивного роста чаще характеризовались функционально значимыми нарушениями в генах клеточной миграции. Таким образом, опухоли молочной железы с коллективной и индивидуальной инвазией, несмотря на отсутствие существенных различий в мутационном ландшафте, отличаются друг от друга спектром нарушений в генах клеточной миграции.

Заключение. Опухоли молочной железы с индивидуальным и коллективным вариантом инвазивного роста характеризуются различиями в мутационном ландшафте, в частности в спектре сигнальных путей и мутантных генов клеточной миграции, подверженных нарушениям.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и НЦНИ в рамках научного проекта № 18-515-16002.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Friedl P., Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms // *Nature Reviews Cancer*. – 2003. – Vol. 3. – P. 362-374.
2. Крахмаль Н.В., Завьялова М.В., Денисов Е.В., Вторушин С.В., Перельмутер В.М. Инвазия опухолевых эпителиальных клеток: механизмы и проявления // *Acta Naturae*. – 2015. – Т. 7 – №2. – С.18-30.
3. Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Гарбуков Е.Ю., Глушенко С.А. Сопряженность лимфогенного метастазирования и гистологического строения инфильтративного компонента протокового рака молочной железы // *Сибирский онкологический журнал*. – 2006. – № 1. – С. 32-35.
4. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Гарбуков Е.Ю. Особенности гематогенного метастазирования при раке молочной железы в зависимости от гистологического строения опухоли // *Сибирский онкологический журнал*. – 2006. – № 3. – С. 29-33.
5. Denisov E.V., Skryabin N.A., Gerashchenko T.S., Tashireva L.A., Wilhelm J., Buldakov M.A., Sleptcov A.A., Lebedev I.N., Vtorushin S.V., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Clinically relevant morphological structures in breast cancer represent transcriptionally distinct tumor cell populations with varied degrees of epithelial-mesenchymal transition and CD44+CD24- stemness // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8 – P. 61163–61180.
6. Gerashchenko T.S., Zavyalova M.V., Denisov E.V., Krakhmal N.V., Pautova D.N., Litviakov N.V., Vtorushin S.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Intratumoral Morphological Heterogeneity of Breast Cancer As an Indicator of the Metastatic Potential and Tumor Chemosensitivity // *Acta Naturae*. – 2017. – Vol. 9 (1). – P. 56-67.
7. Heberle H., Meirelles G. V., da Silva F. R., Telles G. P., Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams // *BMC Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 16. – P. 169.
8. Liberzon A., Birger C., Thorvaldsdóttir H., Ghandi M., Mesirov J.P., Tamayo P. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection // *Cell Systems*. – 2015. – Vol. 1(6). – P. 417-425.

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ЭЛЕМЕНТОВ В ВОЛОСАХ У ДЕТЕЙ БОЛЬНЫХ АУТИЗМОМ

А.В. Обухова

Научный руководитель: профессор, д.т.н. В.И. Отмахов

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

E-mail: nastyuffka201095@gmail.com

ESTIMATION OF THE ELEMENTS CONTENT IN HAIR OF CHILDREN WITH AUTISM

A.V. Obukhova

Scientific Supervisor: Prof., Dr. V.I. Otmakhov

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

E-mail: nastyuffka201095@gmail.com

***Abstract.** Autism Spectrum Disorder is a complex disorder of nervous development that occurs from early childhood and affects daily activities. The condition is characterized by difficulties of social interaction, communication problems and limited, repetitive patterns of behavior, interests or actions. An excess or deficiency of natural microelements is involved in the etiology of autism. Since heavy metals disrupt enzyme functions and cellular signaling processes and generate oxidative stress, leading to apoptosis, they can play a fundamental or modulating role in the etiology of autism. The introduction of highly sensitive analytical methods made it possible to detect elements that are present in biological material, including hair. Hair is a widely used object for assessing the state of microelements. This biological matrix has several advantages over blood and urine. In particular, sampling is non-invasive, and the hair is more mineralized than blood and urine.*

Введение. Расстройство аутистического спектра представляет собой сложное расстройство нервного развития, которое проявляется с раннего детства и влияет на повседневную деятельность. Состояние характеризуется трудностями социального взаимодействия, проблемами общения и ограниченными, повторяющимися моделями поведения, интересов или действий. Несмотря на десятилетия научных исследований, этиология аутизма остается неопределенной, поскольку расстройство является сложным и неоднородным с различной степенью тяжести. Прогресс в понимании причин, характера и лечения аутизма требует все возрастающей интеграции понятий, генетических результатов, достижений в когнитивной нейробиологии и клинических наблюдений. Патофизиологическая этиология, которая ускоряет развитие симптомов аутизма, во многих случаях остается неуловимой и противоречивой, но в нее вовлечены как генетические факторы, так и факторы окружающей среды и их взаимодействие.

Избыток или недостаток природных микроэлементов участвует в этиологии аутизма. Поскольку тяжелые металлы нарушают функции ферментов и клеточные сигнальные процессы и генерируют окислительный стресс, приводящий к апоптозу, они могут играть фундаментальную или модулирующую роль в этиологии аутизма. Внедрение высокочувствительных аналитических методов позволило обнаружить элементы, присутствующих в биологическом материале, в том числе в волосах. Волосы являются широко используемой объектом для оценки состояния микроэлементов. Эта биологическая

матрица имеет ряд преимуществ по сравнению с кровью и мочой. В частности, отбор пробы неинвазивный, а волосы более минерализованы по сравнению с кровью и мочой. Анализ волос не дает информации об уровне микроэлементов во всем организме на момент отбора проб, а предоставляет информацию о средней концентрации элементов в волосах за 2–3 месяца до отбора проб [1]. В частности, это коррелирует с уровнями микроэлементов в крови. Для анализа волос целесообразно использовать метод дуговой атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) с многоканальным анализатором спектров излучения (МАЭС).

Цель настоящей работы. Определение уровня концентрации элементов в сравнении с литературными данными, которые выступали в качестве референтных значений, в волосах детей с аутизмом, проживающих на территории города Томска. Выявление возможных связей этих элементов с аутизмом.

Методы исследования. Материалом для исследования являются реальные образцы волос. В исследовании приняли участие 17 детей в возрасте от 4 до 10 лет с аутизмом. В соответствии с МУК 4.1.1482-03 проводился отбор волос 3–4 см от корня. Собранные образцы были минерализованы муфельной печи при постепенном нагреве от 20°C до 450–500°C до постоянной массы и разбавлены в 20 и 200 раз последовательно (в соответствии с МУ ФР.1.31.2017.26324 «Методика измерений массовой концентрации элементов в пробах волос методом атомно-эмиссионного анализа с дуговым возбуждением спектра»). Количественное определение осуществляли методом дуговой атомно-эмиссионной спектроскопии с многоканальным анализатором эмиссионных спектров (ДАЭС с МАЭС) с использованием спектрального комплекса «Гранд» (НПО «Оптоэлектроника», Россия).

Результаты. Результаты эксперимента сопоставлены с рекомендуемыми в настоящее время референтными значениями, предложенные А.В. Скальным в качестве ориентировочных значений (таблица 1). Вследствие ненормального распределения применялись непараметрические методы. Вычислены основные статистические параметры, такие как медиана, интерквартильных размах между 25-м и 75-м процентилем для распределения микроэлементов в волосах.

Таблица 1

Содержание макро- и микроэлементов в волосах детей с аутизмом ($P = 0,95$; $n = 15$), (мкг/г)

Элемент	Референтные значения [2]	Интерквартильный размах		Медиана
		25 процентиль	75 процентиль	
As	0–0,69	0,053	0,76	0,18
Al	9–23	6,6	37	13,3
Cd	0,03–0,18	0,04	0,13	0,06
Co	0,02–0,11	0,02	0,04	0,03
Cr	0,26–0,7	0,05	0,1	0,07
Mn	0,32–0,93	0,61	2,2	1,3
Pb	0,76–2,32	0,76	1,1	0,97
Fe	13–27	8	40	25

Обнаружено значительное увеличение уровня железа в волосах у детей с аутизмом, в отличие от более ранних исследований. В частности, предыдущее исследование выявило снижение содержания железа в волосах [3] и более высокую частоту дефицита железа у детей с аутизмом. Следует отметить, что в литературе имеются данные о значительное повышение содержания железа в волосах у детей, страдающих аутизмом [4].

В данном исследовании выявлена тенденция к снижению уровня хрома. Недостаток данного элемента в волосах у детей с аутизмом согласуется с масштабным исследованием, в котором приняли участие 360 детей [5].

Не было выявлено существенной разницы в уровнях содержания кобальта, кадмия, свинца и мышьяка. Это противоречит исследованию, которое продемонстрировало чрезмерное накопление тяжелых металлов у детей с аутизмом [3].

Обнаружено значительное повышение уровня марганца в волосах у некоторых пациентов с аутистическим расстройством. Механизмы нейротоксичности марганца могут включать окислительный стресс и изменение функционирования транспортера глутамата [4]. Однако есть предположение, что наблюдаемое увеличение может быть следствием загрязнения окружающей среды. Для исключения этого фактора необходимо сравнивать результаты с контрольной группой здоровых детей проживающих в одинаковых условиях на расстоянии от промышленных источников воздействия марганца.

В текущем исследовании уровень алюминия у пациентов с аутизмом был повышен у 35%. Алюминий высоко нейротоксичный металл и может быть существенным фактором, способствующим росту распространенности заболевания.

В то же время настоящее исследование имеет ограничение связано с отсутствием данных о тяжести аутизма, которые могут существенно повлиять на амплитуду изменений уровней микроэлементов.

Вывод. Результаты этого исследования показывают, что содержание хрома, марганца в образцах волос детей с аутизмом заметно отличались от литературных данных. Этиология аутизма не может быть рассмотрена только как следствие недостатка или избытка элементов, но полученные результаты могут стать основой для дальнейших исследований в этой области. Однако стоит отметить, что такого рода эксперимент может быть информативным для исследовательских целей, учитывая современный уровень наших знаний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hair toxic and essential trace elements in children with autism spectrum disorder / Skalny A. V. [et al.] // *Metab Brain Dis.* – 2017. – V. 32. – P. 195–202.
2. Скальный А. В. Референтные значения концентрации химических элементов в волосах, полученные методом ИСП-АЭС // *Микроэлементы в медицине.* – 2003. – Т. 4, вып. 1. – С. 55–56.
3. Lubkowska A. Concentrations of magnesium, calcium, iron, selenium, zinc and copper in the hair of autistic children/ A. Lubkowska, W. Sobieraj // *Trace Elem Electroly.* – 2009. – V. 26, № 2. – P. 72–77.
4. Yorbik O. Chromium, cadmium, and lead levels in urine of children with autism and typically developing controls/ O. Yorbik, I. Kurt, A. Hasimi, O. Ozturk // *Biol Trace Elem Res.* – 2010. – V. 135. – P. 10–15.
5. Yasuda H. Mineral imbalance in children with autistic disorders / H. Yasuda, T. Yonashiro, K. Yoshida, T. Ishii, T. Tsutsui // *Biomed Res Trace Elem.* – 2005. – V. 16. – P. 285–292.

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ**В.С. Овечкина**

Научный руководитель: к.б.н. К.Р. Валетдинова

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,

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

ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН,

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

E-mail: Vs_ovechkina@mail.ru**CHARACTERISTIC OF THE SPINAL MUSCULAR ATROPHY CELL MODEL****V.C. Ovechkina**

Scientific Supervisor: K.R. Valetdinova, PhD

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

Institute of Cytology and Genetics SB RAS,

Russia, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva, 10, 630090

E-mail: Vs_ovechkina@mail.ru

Abstract. *After the induced pluripotent stem cells were obtained by the Yamanako group, experiments on the development of cellular models of disease have become widespread in medical biology. Such models have several advantages: it is possible to recreate the disease at different stages of its development, patient-specific cells have high potential as a platform for screening drugs and conducting experiments. In our work, we performed a comparative description of a previously obtained cellular model of spinal muscular atrophy at different stages of differentiation.*

Введение. Спинальная мышечная атрофия (СМА; Spinal muscular atrophy – SMA) – группа тяжёлых наследственных заболеваний, характеризующихся дегенерацией двигательных нейронов спинного мозга с последующей атрофией поперечнополосатой мышечной ткани. СМА разделяется на 4 типа, которые отличаются степенью тяжести.

Причина заболевания СМА – делеция гена *SMN1*, который кодирует белок SMN, участвующий в сплайсинге пре-мРНК, транспортировке зрелых мРНК и росте аксонов. В норме данный белок кодируется также его отличающимся паралогом *SMN2*, однако в таком случае лишь 15% транскриптов являются полными, а остальные 85% молекул мРНК не имеют в своём составе седьмого экзона и являются дефектными – с них считывается нестабильный белок, неспособный принимать участие в сплайсинге пре-мРНК. Ген *SMN2*, в отсутствие нормального *SMN1* является основным геном-модификатором СМА: чем больше копий гена *SMN2* содержится в геноме пациента, тем более сглажены симптомы заболевания [1,2].

Несмотря на то, что генетические основы патогенеза СМА хорошо изучены, точные молекулярные механизмы развития заболевания до сих пор остаются невыясненными. Изучение патологических процессов, происходящих в дефектных нейронах, затруднительно по причине невозможности их получения безопасным и неинвазивным способом из организма пациента, а постмортальные нейроны

дают представление только о терминальной стадии заболевания. Для решения данных проблем были созданы клеточные модели СМА на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которые позволяют моделировать заболевания на разных этапах нейральной дифференцировки. В ходе нашей работы мы выполним сравнительную характеристику клеточных линий, полученных от пациентов с разным типом СМА, на разных стадиях нейральной дифференцировки.

Экспериментальная часть. В данной работе были использованы линии ИПСК от трёх пациентов: условно здорового, СМА I и II типов; они ранее были получены в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН к.б.н. н.с. Валетдиновой К.Р. [3]. Линия мононуклеаров с фенотипом СМА III типа была предоставлена Научно-исследовательским институтом акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта.

Для проведения исследования были использованы образцы РНК, полученные из каждой клеточной линии с помощью фирменного набора TRIzol Reagent, из которых методом обратной транскрипции была получена кДНК. С помощью открытого интернет ресурса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) были подобраны пары праймеров для оценки количества транскриптов генов *SMN1*, *SMN2*, *PLS3*, *SLC23A2*, *NCALD*, *RPL6*, *CDKA2P1* [3-5], чьи продукты участвуют в развитии СМА. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе LightCycler 480 (Roche). Для проведения количественной оценки экспрессии белка SMN был проведён вестерн-блот анализ всех полученных клеточных линий на стадии предшественников моторных нейронов и ИПСК. Статистическая обработка результатов проведена с помощью непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса для независимых групп с использованием программного обеспечения Statistica 64. Значимыми считались различия при значении параметра вероятности $p < 0,05$.

Результаты. В ходе анализа был оценён уровень экспрессии главного гена-модификатора СМА *SMN2* в клетках на разной стадии дифференцировки как условно здорового пациента, так и пациентов со СМА I и II типов. Показано, что в клетках условно здорового пациента понижен уровень неполноразмерных транскриптов относительно клеток с фенотипами СМА I и СМА II. Также наблюдается увеличение количества неполноразмерного транскрипта в клетках СМА II относительно СМА I. Далее в тех же клеточных культурах был оценён уровень экспрессии полноразмерного транскрипта SMN, транслируемого в функциональный белок SMN. В основном он считывается с гена *SMN1*, однако, у пациентов со СМА ген *SMN1* делетирован. Полученные данные выявили достоверные различия в количестве полноразмерных транскриптов среди клеток на всех стадиях дифференцировки. Таким образом, показано, что наибольшее количество полноразмерного транскрипта содержится в клетках, полученных от условно нормального пациента, а наименьшее – в клетках от пациентов со СМА.

Экспрессия гена *PLS3* в культуре фибробластов не имеет значимых различий между пациентами, однако в ИПСК и клетках на разных стадиях дифференцировки наблюдается различие в экспрессии *PLS3* среди линий с нормальным фенотипом и обоими типами СМА. Также в ИПСК и культуре незрелых моторных нейронов обнаружено достоверное различие между экспрессией гена в клетках, полученных от пациента со СМА I, и от пациента со СМА II: при более тяжёлой форме заболевания отмечен более высокий уровень транскрипта гена *PLS3*, что соответствует ранее описанным результатам. В случае с геном *SLC23A2* достоверные различия были обнаружены только на стадии предшественников моторных нейронов. Показано уменьшение уровня транскрипта при СМА относительно нормального фенотипа, что

объясняется увеличением уровня метилирования промоторной области гена при СМА. Транскрипт гена *NCLD*, как и ожидалось, отсутствовал в культуре фибробластов и ИПСК, и детектировался в клетках, вовлечённых в процесс нейральной дифференцировки. Здесь уровень экспрессии гена в норме был значительно выше, чем при СМА, что соответствует литературным данным. В случае генов *CDK2AP* и *RPL6* в литературных данных есть сведения только о том, что эти гены могут быть ассоциированы со СМА, но каким образом и по какому механизму они действуют при развитии заболевания – пока неизвестно. В случае *CDK2AP* показано, что количество транскрипта выше в норме и при СМА II типа, чем при СМА I типа. В случае гена *RPL6* показано, что уровень экспрессии выше в клетках со СМА I типа относительно остальных линий.

Вестерн-блот анализ выявил снижение количества белка SMN в клетках предшественников моторных нейронов ($p=0,005$) и ИПСК ($p=0,005$), демонстрирующих фенотип СМА I и СМА II по сравнению с нормой. Полученные сведения соответствуют вышеописанными данными, полученными в предыдущих работах: при СМА в клетках уменьшается количество белка SMN относительно нормы.

Заключение. Показано снижение уровня экспрессии полноразмерного транскрипта SMN на всех стадиях нейральной дифференцировки в клеточных моделях, с фенотипом СМА I и II типов относительно нормы. Также выявлено увеличение уровня неполноразмерного транскрипта SMN Δ 7, связанное с увеличением числа копий *SMN2* в геноме. Показано изменение транскрипции генов-модификаторов: при СМА I типа в зрелых моторных нейронах увеличивается количество транскриптов гена *RPL6*, а также уменьшается уровень экспрессии *PLS3*, *NCLD*, *CDK2AP1*. Показано уменьшение белка SMN в культуре предшественников моторных нейронов и ИПСК, полученных от пациентов со СМА I и II типов, по сравнению с клетками, полученными от условно здоровых пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ogino S., Gao S., Leonard D.G.B., Paesler M., Wilson R.B. Inverse correlation between *SMN1* and *SMN2* copy numbers: Evidence for gene conversion from *SMN2* to *SMN1* // European Journal of Human Genetics. – 2003. – № 11(3). – P. 275–277.
2. Валетдинова К.Р. Получение модельной системы спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека: автореферат дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2016. – 29 стр.
3. Alrafiah A., Karyka E., Coldicott I., Iremonger K., Lewis K.E., Ning K., Azzouz M. Plastin 3 promotes motor neuron axonal growth and extends survival in a mouse model of spinal muscular atrophy // Molecular therapy – methods and clinical development. – 2018. – № 9. – P. 81–89.
4. Zheleznyakova G.Y., Nilsson E.K., Kiselev A.V., Maretina M.A., Tishchenko L.I., Fredriksson R., Schiöth H.B. Methylation levels of *SLC23A2* and *NCOR2* genes correlate with spinal muscular atrophy severity // PLoS ONE. – 2015. – № 10(3). – P. 1–14.
5. Riessland M., Kaczmarek A., Schneider S., Swoboda K.J., Löhr H., Bradler C, Wirth B. Neurocalcin Delta Suppression Protects against Spinal Muscular Atrophy in Humans and across Species by Restoring Impaired Endocytosis // American Journal of Human Genetics. – 2017. – № 100(2). – P. 297–315.

**ВЛИЯНИЕ РЕДОКС ПОТЕНЦИАЛА ПЕЧЕНИ НА ПРОЦЕСС ФОРМИРОВАНИЯ ИНВАЗИИ
OPISTHORCHIS FELINEUS**

Е.А. Перина

Научный руководитель: доцент, к.б.н. В.В. Иванов
Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050
E-mail: catherineperina@gmail.com

**INFLUENCE OF REDOX OF THE LIVER IN THE PROCESS OF THE INVASION
OF OPISTHORCHIS FELINEUSE**

E.A.Perina

Scientific Supervisor: Associate Professor, Ph.D. V.V. Ivanov
Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovskii tract, 2, 634050
E-mail: catherineperina@gmail.com

Abstract. *On the experimental model of opisthorchiasis shows the role of the glutathione system in the process of the invasion of *Opisthorchis felineus*. Treatment of the infected hamsters with antioxidant N-acetylcysteine increased the redox balance of the glutathione system in the liver. Treating infected hamsters with L-buthionine-S, R-sulfoximine, a selective inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase, reduce the oxidized form of the tripeptide and decrease the redox balance of the glutathione system in the liver. The state of the glutathione system in hamster liver affects the formation of *O. felineus* invasion. An increase in the antioxidant potential of the glutathione system of N-acetylcysteine, reduces the intensity of invasion induced by *O. felineus*. L-butionin-sulfoximine in an experimental model of opisthorchiasis does not affect on the worms amount.*

Введение. Печеночный сосальщик *Opisthorchis felineus*, который вызывает описторхоз, заболевание крайне распространённое для Сибирского региона. Инвазия *O. felineus* сопровождается хроническим воспалением гепатотобилиарной системы, приводящим к изменению функционального состояния клеток. Одним из механизмов защиты печени и желчных протоков от инвазии *O. felineus* является система глутатиона. Глутатион – основной антиоксидант клеток печени, который участвует во многих клеточных процессах.

Материалы и методы исследования. Для определения влияния состояния системы глутатиона на процесс формирования инвазии *O. felineus* было воспроизведена экспериментальная модель описторхоза на золотистых хомяках *Mesocricetus auratus* в соответствии с рекомендациями Фармакологического комитета Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ. Хомяки были разделены случайным образом на 3 экспериментальные группы по 8 хомяков в каждой. Первая группа – животные с инвазией *O. felineus*. Вторую и третью группы животных за две недели до заражения поили водой с добавлением предшественника глутатиона (N-ацетилцистеин, НАС) и ингибитора его синтеза (L-бутионин-сульфоксимин, BSO) соответственно. После заражения животных 50 метацеркариями *O. felineus* хомяков еще 4 недели продолжали поить водой, содержащей 0,1% раствор N-ацетилцистеина или 5ммоль раствор L-бутионин-сульфоксимины. После асфиксии животных углекислым газом изолировали печень и в гепатобилиарном тракте подсчитывали количество зрелых форм *O. felineus*. Для статистической обработки был использовано ПО

GraphPad Prism 5. Данные представлены в виде медианы и квартилей (Me (Q1 - Q3)). Для проверки достоверности различий количественных показателей в сравниваемых группах использовали критерий Краскела - Уоллиса и критерий Манна-Уитни с применением поправки на множественное сравнение Бенджамини - Хохберга. Статистические показатели считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Употребление экспериментальными животными селективного ингибитора синтеза глутатиона BSO на фоне инвазии привело к значительному увеличению концентрации GSSG в печени, тогда как уровни общего глутатиона и GSH снизились до 24,6 и 20,2 нмоль/мг белка, соответственно, и были значительно ниже, чем в других экспериментальных группах ($p < 0,05$ для обеих групп) (таблица 1).

Таблица 1

Влияние *N*-ацетилцистеина (NAC) и *L*-бутионин-сульфоксими́на (BSO) на содержание общего (GSH + GSSG), восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона в печени хомяков на фоне инвазии *O. felinus*.
(Me (Q1 - Q3), $p < 0,05$)

Показатели	Экспериментальные группы		
	<i>O. felinus</i> , n=6	<i>O. felinus</i> + NAC, n=6	<i>O. felinus</i> + BSO, n=6
GSH + GSSG, нмоль/мг белка	30,3 (28,5 - 35,7)	42,2 (35,0 - 44,7)*	24,6 (20,5 - 27,8)*#
GSH, нмоль/мг белка	26,3 (22,7 - 34,0)	33,12 (27,9 - 36,5)	20,2 (17,2 - 23,6) *#
GSSG, нмоль/мг белка	3,9 (2,4 - 4,3)	3,1 (2,2 - 3,9)	5,3 (3,7 - 7,8)#
GSH/GSSG	9,4 (7,9 - 13,4)	15,8 (13,5 - 19,4)*	6,8 (5,3 - 7,7) *#

Примечание: NAC – 0,1% раствор в питьевой воде, BSO – 5 ммоль раствор в питьевой воде, $p < 0,05$ по сравнению с показателем: * животных с инвазией *O. felinus*, # животных с инвазией *O. felinus*, принимающих *N*-ацетилцистеин.

Между тем, в группе хомяков, получавшей NAC, содержание общего глутатиона был выше, чем в группе с инвазией *O. felinus*, преимущественно за счет увеличения восстановленной формы трипептида.

Состояние системы глутатиона в печени хомяков влияет и на формирование инвазии *O. felinus*. Повышение антиоксидантного потенциала системы глутатиона предшественником его синтеза – NAC снижает интенсивность инвазии, индуцированной *O. felinus* (рисунок 1).

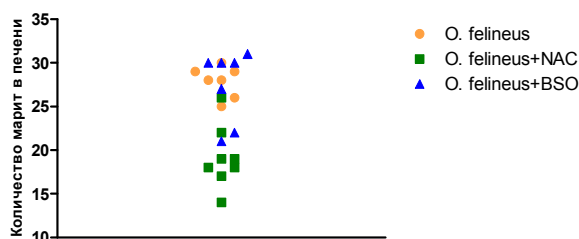


Рис. 1. Влияние *N*-ацетилцистеина (NAC) и *L*-бутионин-сульфоксими́на (BSO) на количество зрелых форм в гепатобилиарном тракте хомяков при заражении *O. felinus*

Это обусловлено тем, что NAC наряду с антиоксидантным эффектом, обладает иммуномодулирующим действием, механизмы которого до конца не изучены. NAC хорошо всасывается и способен стимулировать фагоцитоз, увеличивая хемотаксис лейкоцитов и снижая уровень провоспалительных цитокинов TNF и IL-8, которые повышают продукцию оксидантов клетками иммунной системы при воспалении [1]. Окислительный

стресс в организме хозяина при инвазии *O. felinus* приводит к дизрегуляции системы глутатиона, что в свою очередь влияет на функции лейкоцитов, чувствительных к окислительно-восстановительному потенциалу системы. Полученные результаты подтверждаются данными о том, что НАС повышает терапевтический потенциал артемизинина против инфекции *Schistosoma mansoni*, и этот механизм обусловлен нормализацией дисбаланса системы глутатиона в печени хозяина и повышением активности глутатион-зависимых ферментов антиперекисной защиты [2]. Это позволяет рассматривать НАС в качестве эффективного профилактического средства от заражения описторхозом.

Употребление экспериментальными животными BSO с питьевой водой в течение 2 недель до заражения и 4 недель после заражения *O. felinus*, не оказывало влияния на количество зрелых форм в печени. Снижение иммунного ответа организма хозяина и окислительный стресс, индуцируемый BSO, может оказывать влияние на метаболизм и жизнеспособность самих паразитов. В экспериментах на нематодах *Caenorhabditis elegans* было показано, что окислительный стресс снижает жизнеспособность, рост и локомоцию червя [3]. BSO в большей степени способен ингибировать ключевой фермент синтеза глутатиона - гамма-глутамилцистеин синтетазу у нематод. Константа ингибирования γ -глутамилцистеин синтетазы у возбудителя филяриоза *Onchocerca volvulus* составляет 0,13 мкМ, что в 54 раза ниже, чем у фермента млекопитающих [4]. Индуцированный BSO окислительный стресс в печени экспериментальных животных влияет на систему глутатиона хозяина, модулирует иммунный ответ, изменяет активность глутатион-зависимых ферментов защиты самого паразита, что влияет на их жизнеспособность.

Заключение. Употребление хомяками НАС с питьевой водой повышает редокс-баланс системы глутатиона в печени на фоне инвазии *O. felinus*. Ингибитор синтеза глутатиона BSO на фоне инвазии *O. felinus* вызывал более выраженный дисбаланс в системе глутатиона и окислительный стресс. Состояние системы глутатиона в печени хомяков влияет на формирование инвазии *O. felinus*. Повышение антиоксидантного потенциала системы глутатиона предшественником его синтеза, N-ацетилцистеином, снижает интенсивность инвазии, индуцированной *O. felinus*. L-бутионин-сульфоксимин в экспериментальной модели описторхоза не влияет на количество зрелых форм.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-415-703011

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Andrade K., Moura F., dos Santos J. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: therapeutic possibilities of N-acetylcysteine // International journal of molecular sciences. – 2015. – V. 16, № 12. – P. 30269-30308.
2. Arranz L., Fernandez C., Arranz R.A. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women // Free radical biology & medicine. – 2008. – V. 45, № 9. – P. 1252-1262.
3. Wu Q., Nouara A., Li Y. et al. Comparison of toxicities from three metal oxide nanoparticles at environmental relevant concentrations in nematode *Caenorhabditis elegans* // Chemosphere. – 2013. – V. 90, №. 3. – P. 1123-31.
4. Luersen K., Müller S., Hussein A. et al. The gamma-glutamylcysteine synthetase of *Onchocerca volvulus* // Mol Biochem Parasitol. – 2000. – V. 111, №. 2. – P. 243-51.

**РОЛЬ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА БЕТА 1 В МЕХАНИЗМАХ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ТРИМЕТИЛОЛОВОМ**

Е.В. Першина, Э.Р. Камалтдинова

Научный руководитель: д.б.н. В.И. Архипов

Пушкинский государственный естественно-научный институт,

Россия, г. Пушкино, просп. Науки, 3, 142290

Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН),

Россия, г. Пушкино, ул. Институтская, 3, 142290

E-mail: pershina-ev@mail.ru

**THE ROLE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 IN THE MECHANISMS OF
NEURODEGENERATION CAUSED TRIMETHYLTIN**

E.V. Pershina, E.R. Kamaltdinova

Scientific Supervisor: Dr. V.I. Arkhipov

Pushchino State Institute of Natural Sciences, Russia, Pushchino, pr. Nauki, 3, 142290

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences (ITEB RAS), Russia,

Pushchino, Institutskaya str., 3, 142290

E-mail: pershina-ev@mail.ru

Abstract. *The role of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) was studied to assess his involvement to mechanisms of neurodegeneration in the hippocampus caused by neurotoxicant trimethyltin chloride (TMT). Level of TGF- $\beta 1$ were measured the in the hippocampus and the prefrontal cortex using ELISA at 2 and 4 week after TMT injection. The mRNA level of both TGF- $\beta 1$ itself and its receptors was determined by the method of qPCR at 1, 3, and 6 week after TMT injection. The results showed that the expression level of TGF- $\beta 1$ genes and its receptor TGF- $\beta 1$ RI is significantly increased both in the prefrontal cortex and in the hippocampus under the influence of TMT. However, the content of the cytokine itself increased slightly. Interestingly, the expression of TGF- $\beta 1$ RII didn't undergo any changes as a result of damage to the hippocampus by the neurotoxicant. We suggest that increased expression of the TGF- $\beta 1$ RI genes indicates the need to increase the activity of this receptor to enhance neuroprotection after TMT intoxication.*

Введение. Для экспериментально вызванной нейродегенерации в гиппокампе использовали хлорид триметиллолова (ТМТ). Механизмы действия ТМТ на мозг хорошо исследованы. Гибель нейронов происходит в лимбической системе мозга, преимущественно в гиппокампе [1, 2]. Важной особенностью действия ТМТ является спонтанное восстановление, и нормализация некоторых функций мозга, что свидетельствует о достаточно успешных компенсаторных процессах, развивающихся в мозге, которые необходимо исследовать [3].

Трансформирующий фактор роста- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) – многофункциональный пептид, который является противовоспалительным цитокином, а также трофическим фактором. В мозге TGF- β реализует свое действие через рецепторы TGF- β RI и TGF- β RII. В последние годы TGF- β привлек внимание как потенциальная терапевтическая мишень при нарушениях мозга [4].

В работе исследовали роль TGF- β 1 в условиях нейродегенеративных явлений гиппокампа, вызванных нейротоксикантом хлоридом триметилолова (TMT).

Материалы и методы. Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар (n=40) весом 210–220 г. Подопытной группе вводили хлорид триметилолова TMT (7,5 мг/кг, п/к); контрольной группе – изотонический раствор NaCl в том же объеме. Действие TMT проявлялось в виде снижения массы тела, агрессии и судорожной активности у животных. Для предотвращения судорог животным через 48 часов после инъекции TMT вводили нембутал (20 мг/кг, в/б). Через 2 и 4 недели после TMT определяли количественное содержание белка TGF- β 1 в гиппокампе и префронтальной коре с помощью коммерческого набора Sandwich ELISA Kits (Product No.SEA124Ra) в соответствии с инструкциями производителя. Уровень мРНК TGF- β и его рецепторов в структурах мозга определяли через 1, 3 и 6 недель после инъекции TMT методом ОТ-ПЦР с предварительно синтезированными праймерами. В качестве референсного гена использовали бета-актин. Праймеры:

β -actin (*Actb*) F 5'-3' ATGGTGGGTATGGGTCAGAA R 5'-3' CTTTTCACGGTTGGCCTTAG;
 TGF- β 1 (*Tgfb1*) F 5'-3' AGAGCCCTGGATACCAACTA R 5'-3' GACCTTGCTGTACTGTGTGT;
 TGF- β RI (*Tgfr1*) F 5'-3' GCTGACATCTATGCAATGGG R 5'-3' ATATTTGGCCTTAACTTCTGTTC;
 TGF- β RII (*Tgfr2*) F 5'-3' CCAGGGCATCCAGATCGTGTG R 5'-3' TAGTGTTTCAGGGAGCCGTCTT;

Результаты. Уровень мРНК TGF- β 1 на ранней стадии нейродегенерации через 1 неделю после TMT в гиппокампе достоверно повышался (Рис.1 А). Содержание белка TGF- β 1 в гиппокампе повышался через 2 недели после TMT (Рис.1 Б). Через 3 недели после TMT экспрессия генов TGF- β 1 приходила к нормальному уровню.

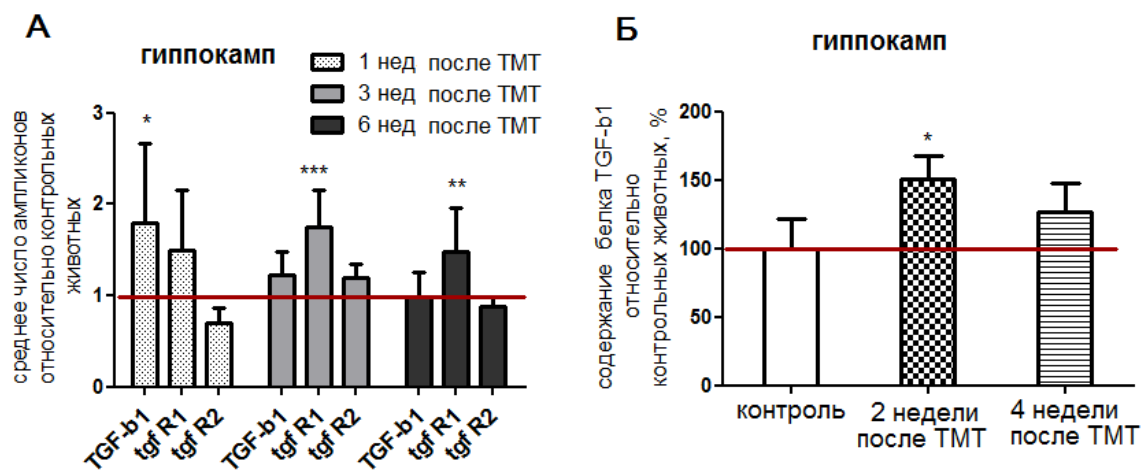


Рис. 1. А - Экспрессия генов TGF- β 1 и его рецепторов в гиппокампе через 1, 3 и 6 недель после TMT (уровень экспрессии контрольных животных принят за единицу, горизонтальная линия); Б - Изменение содержания белка TGF- β 1 в гиппокампе через 2 и 4 недели после TMT (за 100% взято значение для контрольной группы, горизонтальная линия); * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.001$, *** – $p < 0.0001$ (ANOVA с последующим множественным сравнением, тест Даннета)

Что касается рецепторов TGF- β 1, через 1 неделю после TMT в гиппокампе экспрессия их генов не отличалась от контрольного уровня, а через 3 и 6 недель уровень мРНК TGF- β 1RI достоверно повышался (Рис.1 А). Эти изменения свидетельствуют о потребности увеличения TGF- β 1RI.

В префронтальной коре на контрольном уровне были экспрессия генов TGF- β 1 (Рис.2-А) через 1 неделю после TMT, а также содержание белка TGF- β 1 через 2 недели после TMT (Рис.2-Б). Уровень мРНК TGF- β 1 через 3 и 6 недель был повышенным (Рис.2-А). Содержание белка TGF- β 1 через 4 недели после TMT также имело тенденцию к повышению (Рис.2-Б).

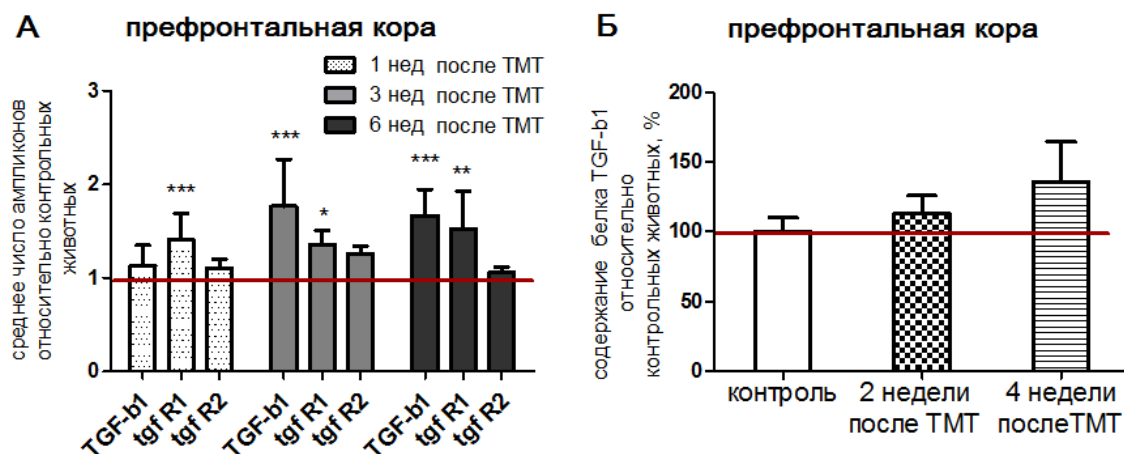


Рис. 2. А – Экспрессия генов TGF- β 1 и его рецепторов в префронтальной коре через 1, 3 и 6 недель после TMT (уровень экспрессии контрольных животных принят за единицу, горизонтальная линия); Б – Изменение содержания белка TGF- β 1 в префронтальной коре через 2 и 4 недели после TMT (за 100% взято значение для контрольной группы, горизонтальная линия); *– $P < 0.05$, **– $P < 0.001$, ***– $P < 0.0001$ (ANOVA с последующим множественным сравнением, тест Даннета)

В нейродегенеративные/протекторные явления, после TMT, вовлекался TGF- β 1RI, уровень мРНК этого рецептора был повышен в префронтальной коре во всех исследуемых временных сроках (1,3,6 недель) после TMT.

Заключение. Полученные результаты показали, что уровень экспрессии генов TGF- β 1 и его рецептора TGF- β 1RI значительно повышался как в префронтальной коре, так и в гиппокампе после TMT-интоксикации. Однако, содержание самого цитокина увеличилось незначительно. Экспрессия TGF- β 1RIII не изменялась в результате повреждения гиппокампа нейротоксикантом. Мы предполагаем, что повышенный уровень мРНК TGF- β 1RI указывает на потребность увеличения этого рецептора как компенсаторный механизм для нейропротекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pershina E.V., Mikheeva I.B., Kamaltdinova E.R., Arkhipov V.I. Expression of mGlu receptor genes in the hippocampus after intoxication with trimethyltin // J Mol Neurosci. – 2019. – Vol. 67., № 2. – P. 258-264.
2. Першина Е.В., Михеева И.Б., Камалтдинова Э.Р., Архипов В.И., Морфофункциональные изменения в гиппокампе крыс после воздействия хлорида триметиллолова // Цитология. – 2018. – Т. 60., №7. – С. 544.
3. Lee S., Yang M., Kim J., Kang S., Kim J. et al. Trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration: A mechanism-based review // Brain Res Bull. – 2016. – Vol. 125. – P. 187-199.
4. Krieglstein K., Zheng F., Unsicker K., Alzheimer C. More than being protective: functional roles for TGF- β /actinin signaling pathways at central synapses // Trends Neurosci. – 2011. – Vol. 34. – P. 421-429.

**НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИИ ФУНКЦИИ КОГНИТИВНОГО
КОНТРОЛЯ У ПАЦИЕНТОВ С АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТЬЮ**

А.Г. Пешковская, С.А. Галкин

Научный руководитель: Академик РАН, профессор, д.м.н. Н.А. Бохан
Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный
исследовательский центр Российской академии наук,
Россия, г. Томск, ул. Алеутская, 4, 634014
E-mail: peshkovskaya@gmail.com

**NEUROPHYSIOLOGICAL FEATURES OF COGNITIVE CONTROL
IN PATIENTS WITH ALCOHOL DEPENDENCE**

A.G. Peshkovskaya, S.A. Galkin

Scientific Supervisor: Academician of Russian Academy of Sciences, Prof., Dr. Med. N.A. Bokhan
Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation
Russia, Tomsk, Aleutskaya str., 4, 634014
E-mail: peshkovskaya@gmail.com

***Abstract.** Deficiency in cognitive control is widely considered to contribute to maintenance and relapse of alcohol dependence and other addictive disorders. In this study, we tested neurophysiological parameters of cognitive control in patients with alcohol dependence. EEG, clinical and cognitive measures were obtained in 30 detoxified alcohol-dependent patients. Significant increase in beta-power was found in the frontal and central brain areas among patients in comparison with healthy subjects. We also identified associations of cognitive control deficiency and clinical parameters of alcoholism, which can serve as potential indicators for assessing the severity of the disease.*

Введение. Когнитивный контроль представляет собой важную функцию, которая позволяет быстро адаптировать поведение в соответствии с изменениями среды путем перманентного перераспределения когнитивных ресурсов. Одна из специфических функций когнитивного контроля – сдерживание нежелательных действий (inhibition) – является важным компонентом саморегуляции поведения. Недостаточность данной функции характеризуется импульсивным поведением и выступает наиболее характерным нарушением при алкогольной зависимости, а также способствует формированию когнитивного дефицита [1-6].

Нейрофизиологические исследования подтвердили вклад лобных областей головного мозга в реализацию когнитивного контроля, маркеры которого зафиксированы в префронтальной коре [7, 8]. Однако нейронные корреляты дефицита когнитивного контроля, в частности, процессов ингибиции при алкоголизме все еще недостаточно ясны.

В связи с изложенным, цель данного исследования – определение характера нарушений когнитивного контроля и специфики его нейрофизиологических коррелятов при алкоголизме во взаимосвязи с клиническими заболеваниями.

Материалы и методы. В исследование включены данные 30 пациентов с алкогольной зависимостью (F10.2) после детоксикации (средний возраст $47,21 \pm 9,23$ лет; длительность заболевания $15,47 \pm 12,21$ лет). Контрольную группу составили 30 здоровых испытуемых (средний возраст $41,25 \pm 13,09$ лет). Все участники исследования имели нормальное или скорректированное до нормального зрение, не принимали лекарств и не страдали от расстройств или травм центральной нервной системы. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИ психического здоровья Томского национального исследовательского медицинского центра РАН. Экспериментальная процедура проведена в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Визуальные стимулы для исследования когнитивного контроля предъявлялись на экране компьютера. Исследование нейрофизиологических параметров активности головного мозга проводилось на 16-канальном электроэнцефалографе «Неврополиграф» с вычислением значений спектральной мощности альфа- и бета-ритмов (мкВ^2) в лобных, центральных и височных отведениях. Исследование нейрофизиологических параметров осуществлялось с регистрацией фона с открытыми глазами (1 мин.), пробы с когнитивной нагрузкой (задача Go/No-go). Мощность альфа-ритмов (7,5-12 Hz) и бета-ритмов (13-34 Hz) анализировалась в соответствии с принятой методологией (International Federation of Clinical Neurophysiology).

Результаты. Анализ различий показал большее количество ошибок в группе пациентов: в среднем 7,35 против 3,25 в контрольной группе ($p = 0,039$), что отражает недостаточность когнитивных процессов, в частности, функции когнитивного контроля при алкогольной зависимости.

Для оценки влияния алкоголизма на биоэлектрическую активность головного мозга был проведен дисперсионный анализ. В качестве независимых переменных мы рассматривали 1) группу пациенты vs здоровые лица группы контроля и 2) область головного мозга; зависимыми переменными стали средние значения мощности альфа и бета ритмов. Анализ показал высокий уровень значимости различий между здоровыми лицами и пациентами в характеристиках бета ритма $\lambda = 0,906$, $F(2, 115) = 5,961$, $p = 0,003$. Процесс подавления реакции, как составляющей функции когнитивного контроля, актуализированного при помощи Go/No-go задачи характеризовался значимым повышением мощности бета-ритма во фронтальных ($p = 0,004$) и центральных областях ($p = 0,029$) среди пациентов в сравнении со здоровыми испытуемыми. Статистически значимых различий альфа-активности выявлено не было ($F = 1,407$, $p = 0,238$).

Кроме того, неэффективная реализация контроля над импульсами у пациентов была связана с клиническими параметрами алкогольной зависимости: количеством госпитализаций пациентов (0,54, $p = 0,028$), уровнем толерантности к алкоголю (0,62, $p = 0,028$) и максимальной длительностью светлого промежутка в месяцах (-0,42, $p = 0,010$).

Заключение. В исследовании показано, что ряд важных клинических параметров алкогольной зависимости связан с уровнем сохранности когнитивного контроля у пациентов. При активации данного когнитивного процесса пациенты продемонстрировали большее число ошибок, чем здоровые испытуемые. Более того, ошибки пациентов, связанные с недостаточностью когнитивного контроля, имели характер двигательной автоматической реакции на стимул, что подтвердилось повышением бета-ритма в моторных областях коры головного мозга у пациентов. Указанные особенности бета-активности у лиц с алкогольной зависимостью, очевидно, обусловлены трофическими изменениями во фронтальных и центральных отделах головного мозга, поскольку мощность бета-ритма положительно коррелирует с

метаболической активностью в соответствующей мозговой области. Современные исследования подтверждают, что лица с алкогольной зависимостью страдают от дисфункции тормозных механизмов центральной нервной системы, действующих на уровне системы моторных областей головного мозга [9]. Результаты проведенного нами исследования согласуются с данными представлениями.

В свою очередь, выявленные ассоциации недостаточности когнитивного контроля и клинических параметров алкоголизма могут служить потенциальными индикаторами для оценки тяжести заболевания.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-313-00147.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Domínguez-Salas S., Díaz-Batanero C., Lozano-Rojas O.M., Verdejo-García A. Impact of general cognition and executive function deficits on addiction treatment outcomes: systematic review and discussion of neurocognitive pathways // *NeurosciBiobehav Rev.* – 2016. – № 71. – P. 772–801.
2. Schweiger J.I., Bilek E., Schäfer A., Braun U., Moessnang C., Harneit A., Post P., Otto K., Romanczuk-Seiferth N., Erk S. et al. Effects of BDNF Val66Met genotype and schizophrenia familial risk on a neural functional network for cognitive control in humans // *Neuropsychopharmacology.* – 2018. – V. 44, № 3. – P. 590-597.
3. Бохан Н.А., Мандель А.И., Пешковская А.Г., Бадырғы И.О., Асланбекова Н.В. Этнотерриториальная гетерогенность формирования алкогольной зависимости у коренного населения Сибири // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* – 2013. – Т. 113, № 6-2. С. 9–13.
4. Пешковская А.Г. Этно-культуральный диспаратет когнитивных нарушений при алкоголизме // *Неврологический вестник. Журнал им. В.М. Бехтерева.* – 2014. – Т. 46, № 3. – С. 97–98.
5. Пешковская А.Г. Алкогольная зависимость и эмоциональные расстройства: траектория и перспективы исследования управляющих когнитивных функций // *Вестник Российского фонда фундаментальных исследований.* – 2018. – Т. 4, № 100. – С. 58-61.
6. Белокрылов И.И., Пешковская А.Г., Галкин С.А., Рощина О.В. Когнитивное функционирование и психотравмирующие ситуации в контексте алкогольной зависимости // *Вопросы наркологии.* – 2018. – Т.12, № 171. – С. 81-92.
7. Pandey A.K., Kamarajan C., Manz N., Chorlian D.B., Stimus A., Porjesz B. Delta, theta, and alpha event-related oscillations in alcoholics during Go/NoGo task: Neurocognitive deficits in execution, inhibition, and attention processing // *ProgNeuropsychopharmacolBiol Psychiatry.* – 2016. – №65. – P. 158–171.
8. Пешковская А.Г., Галкин С.А. Когнитивный контроль при алкогольной зависимости и его нейрокорреляты // *Вопросы наркологии.* – 2018. – Т. 12, № 171. – С. 65-80.
9. Quoilin C., Wilhelm E., Maurage P., de Timary P., Duque J. Deficient inhibition in alcohol-dependence: let's consider the role of the motor system! // *Neuropsychopharmacology.* – 2018. – V. 43. – P. 1851-1858.

**ВЛИЯНИЕ ЛЕТАЛЬНОЙ МУТАЦИИ *YELLOW* В ГЕНЕ *AGOUTI* НА МОЗГ И ПОВЕДЕНИЕ
ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ С МУТАЦИЕЙ *A53T* В ГЕНЕ *SNCA* ЧЕЛОВЕКА**

А.В. Плюснина, Н.В. Хоцкин

Научный руководитель: д.б.н. А.В. Куликов

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,

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

E-mail: plusninaav@bionet.nsc.ru

**EFFECT OF THE *LETHAL YELLOW* (A^Y) MUTATION IN THE *AGOUTI* GENE
IN BRAIN AND BEHAVIOR OF TRANSGENIC MOUSE WITH THE *A53T* MUTATION IN THE
HUMAN *SNCA* GENE**

A.V. Plyusnina, N.V. Khotskin

Scientific Supervisor: PhD, A.V. Kulikov

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetic SB RAS,

Russia, Novosibirsk, Prospect Lavrentyeva 10, 630090

E-mail: plusninaav@bionet.nsc.ru

Abstract. *Despite the Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease, the etiology and mechanisms of this pathology remain poorly understood to date. It is known that in most cases PD is a multifactorial diseases. Hereditary prepositions is of important factor of the PD development mechanism. The first identified mutation associated with the PD development in humans is the A53T point mutation in the SNCA gene, which has enhanced neurotoxicity and leads to overexpression of the alpha-synuclein protein. It is also known that hereditary metabolic disorders, such as type I and type II diabetes, can influence the development of PD. Obesity and diabetes may exacerbate brain atrophy and cognitive functions in PD with greater vulnerability in the frontal lobes. It is known that the lethal yellow mutation in the mouse agouti gene (A^Y), which causes the ectopic expression of agouti protein in many tissues, including the brain, leads to the development of obesity and type II diabetes. In the present study, we investigated for the first time effect of interaction of A^Y and *SNCA***A53T* mutations on the behavior and brain in mouse. Thus, the *A53T* mutation reduced obesity and the severity of depressive-like behavior in A^Y/a *SNCA***A53T* mice compared to *AY/a* genotype.*

Введение. Несмотря на то, что болезнь Паркинсона (БП) является вторым наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием после болезни Альцгеймера, этиология и механизмы развития данной патологии до настоящего времени остаются малоизученными. Известно, что в большинстве случаев БП является мультифакториальным заболеванием, в механизмах развития которого большое значение придается наследственной предрасположенности. Первой идентифицированной мутацией у человека, ассоциированной с развитием БП, является точечная мутация *A53T* в гене *SNCA*, обладающая повышенной токсичностью (enhanced neurotoxicity) и приводящая к сверхэкспрессии белка альфа-синуклеина [1]. У трансгенных мышей с мутацией *A53T* в возрасте 9-12 недель развиваются паркинсоно-подобные нарушения nigростриатной системы и двигательной

активности, и быстро наступает смерть [2]. Также известно, что на развитие БП могут влиять наследственные нарушения метаболизма, такие как диабет I и II типа [3]. Диабет может усилить атрофию мозга и нарушение когнитивных функций при БП, преимущественно оказывая влияние на лобные доли [4]. Ожирение также является фактором риска развития БП. Важно отметить, что риск развития диабета и ожирения определяется генетическими факторами. Например, известно, что у мышей мутация *lethal yellow* в гене *agouti* (A^Y), вызывающая эктопическую экспрессию белка агутти во многих тканях, включая мозг, приводит к развитию ожирения и диабета 2 типа [5]. Целью данного исследования было впервые изучить влияние взаимодействия мутаций A53T в гене *SNCA* и A^Y на мозг и поведение.

Материалы и методы. Все эксперименты проводились на взрослых (10-12 недель) особях полученных при скрещивании самок C57BL/6-AY (A^Y/a) с самцами SNCA*A53T. В результате скрещивания были получены самцы и самки генотипов: A^Y/a (особи с летальной мутацией yellow в гене *agouti*), SNCA*A53T (особи с мутацией A53T в гене *SNCA*), A^Y/a SNCA*A53T (гибриды с мутацией A53T в гене *SNCA* и с летальной мутацией yellow в гене *agouti*), a/a (C57Bl/6 - особи дикого типа), согласно критерию Пирсона, распределение групп соответствует ожидаемому ($\chi^2=1.6$, $p>0,05$).

Морфометрические параметры жировая масса и вес животных были измерены на томографе EchoMRI-100H (EchoMRI LLC, USA). Для тестирования поведения использовали программно-аппаратный комплекс EthoStudio, разработанный в ФГБНУ «Институт автоматизации и электрометрии СО РАН». Для исследования морфологических различий в размерах мозга у животных *in vivo* мы использовали горизонтальный томограф с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия). Уровень моноаминов и их метаболитов определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Luna C18(2) (Phenomenex, USA) с электрохимическим детектором (DECADE ИТМ Electrochemical Detector; Antec, The Netherlands) и стеклоглеродной ячейкой (VT-03 ячейка 3mm GC sb; Antec, The Netherlands). Для статистической обработки был использован пакет программ Statistica 10.0.

Результаты и обсуждение. В результате поведенческого фенотипирования у животных генотипа A^Y/a обнаружено достоверное отличие веса и жировой массы от остальных групп ($p<0,0001$). У мышей генотипа A^Y/a SNCA*A53T вес и масса жира практически не отличались от контрольной группы, что вероятно, свидетельствует о влиянии мутации в гене *SNCA* на фенотип у мышей с мутацией в гене *agouti*, приводящей к ожирению. В результате поведенческих тестов не были выявлены различия мышей по активности в домашних клетках, сну, потреблению пищи и воды, способности к обучению в водном лабиринте Морриса. В то же время, в тесте «открытое поле» было выявлено достоверное влияние мутации A53T в гене *SNCA* на количество дефекаций ($p<0,005$). У мышей генотипов SNCA*A53T и A^Y/a SNCA*A53T количество дефекаций достоверно меньше ($p<0,001$) по сравнению с диким типом и генотипом A^Y/a , что свидетельствует о пониженной эмоциональности. В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» обнаружен достоверный вклад мутации A53T в гене *SNCA* на исследованную площадь в открытых рукавах ($p<0,05$) (исследованная площадь в открытых рукавах у мышей генотипа SNCA*A53T значительно больше ($p<0,05$), чем у остальных генотипов.)

В тесте «принудительное плавание» с помощью двухфакторного анализа было обнаружено взаимодействие мутации A^Y и мутации в гене *SNCA* на время неподвижности ($p<0,005$). Мутация A^Y резко увеличивала время замирания, тогда как сочетание мутаций A^Y и A53T снижало время замирания у

животных A^Y/a SNCA*A53T. Также обнаружено влияние двух факторов на показатель мобильности ($p < 0,001$), наличие мутации в гене *SNCA* увеличивает показатель мобильности у A^Y/a SNCA*A53T, что свидетельствует о менее депрессивном поведении у гибридов. С помощью магнитно-резонансной компьютерной томографии мозга у мышей представленных линий существенных различий по объему измеренных структур выявлено не было ($p > 0,05$). Однако, обнаружено влияние мутации в гене *SNCA* ($p < 0,0001$) и A^Y ($p < 0,05$) на общий объем мозга у самок. У животных генотипа A^Y размер общего объема мозга значительно меньше, чем у остальных генотипов ($p = 0,000608$). С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии были измерены показатели биогенных аминов и их метаболитов: (дофамин (DA), 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (DOPAC), норадреналин (NA), серотонин (5-HT), 5-гидроксииндолуксусная кислота (5-HIAA), гомованилиновая кислота (HVA)) в коре, стриатуме, гиппокампе и среднем мозге. В коре значительных различий по измеренным показателям не обнаружено. В стриатуме обнаружено влияние мутации A^Y на уровень DOPAC и NA ($p < 0,05$), наличие этой мутации уменьшает количество этих показателей у A^Y/a SNCA*A53T. В гиппокампе обнаружено влияние A^Y на уровень норадреналина, уменьшая количество норадреналина у A^Y/a SNCA*A53T ($p < 0,05$). В среднем мозге обнаружено влияние мутации A53T в гене *SNCA* на уровень DOPAC, данная мутация увеличивает количество DOPAC у A^Y/a SNCA*A53T ($p < 0,05$), и влияние мутации A^Y на уровень HVA ($p < 0,05$), снижая данный показатель у A^Y/a SNCA*A53T. Уровень дофамина в среднем мозге у мышей SNCA*A53T значительно выше, чем у однопометников дикого типа ($p < 0,05$), а уровень норадреналина достоверно отличается между A^Y/a и SNCA*A53T ($p < 0,05$).

Заключение. В настоящем исследовании мы впервые изучили влияние взаимодействия мутаций A^Y и SNCA*A53T на поведение и мозг у мышей. Таким образом, мутация A53T снижала ожирение и выраженность депрессивно-подобное поведения у мышей A^Y/a SNCA*A53T по сравнению с животными A^Y/a .

Благодарности: Исследование поддержано грантом РФФ № 17-15-01032.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Stenroos E. S. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease // *Science*. – 1997. – V.276, № 5321. – P. 2045-2047.
2. Lee M.K., Stirling W., Xu Y., Xu X., Qui D., Price D. L. Human α -synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53→ Thr mutation causes neurodegenerative disease with α -synuclein aggregation in transgenic mice // *Proceedings of the National Academy of Science*. – 2002. – V.99, № 13. – P. 8968-8973.
3. Yue X., Li H., Yan H., Zhang P., Chang L., Li T. Risk of Parkinson disease in diabetes mellitus: an updated meta-analysis of population-based cohort studies // *Medicine*. – 2016. – V. 95, № 18. – P.3549.
4. Petrou M., Davatzikos C., Hsieh M., Foerster B.R., Bohnen, N.I. Diabetes, gray matter loss, and cognition in the setting of Parkinson disease // *Academic radiology*. – 2016. – V. 23, № 5. – P. 577-581.
5. Bazhan N.M., Yakovleva T.V., Kazantseva A.Y., Makarova E.N. Exaggerated anorexigenic response to restraint stress in A^Y mice is associated with elevated CRFR2 mRNA expression in the hypothalamus // *Physiology & behavior*. – 2013. – V.120. – P.19-25.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ДИТЕРПЕНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ
ACONITUM BARBATUM PATR. EX PERS.**

А.А. Романов, М.В. Филонова, П.В. Кульпин

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

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

E-mail: pandanellr@gmail.com

**RESEARCH OF THE COMPOSITION OF DITERPEN ALKALOIDS OF THE CALLUS CULTURE
ACONITUM BARBATUM PATR. EX PERS.**

A.A. Romanov¹, M.V. Filonova^{1,2}, P.V. Kulpin²

Scientific Supervisor: Prof., Dr. A.A. Bakibayev

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

E-mail: pandanellr@gmail.com

Abstract. *In the present study we found the sum of diterpenic alkaloids in the callus culture Aconitum barbatum Pers. identical to the intact plant. This paper compares Sephadex LH-20 sorbent and it's chemically modified analog, azoepoxyadsorbent Sephadex LH-20-NG-EPCG, in chromatography of a model mixture of alkaloids and the amount of alkaloids isolated from tissue culture Aconitum barbatum Pers. azoepoxyadsorbent Sephadex LH-20-NG-EKG, which could not be achieved on the sorbent Sephadex LH-20.*

Введение. Аконитин и родственные дитерпеновые алкалоиды, обнаруженные у видов *Aconitum*, являются высокотоксичными кардиотоксинами и нейротоксинами [1] и применяются в традиционной медицине при лечении ряда воспалительных заболеваний [2]. Так же имеются данные о проявлении противометастатических и церебропротекторных эффектов дитерпеновых алкалоидов [3].

Введение в культуру ткани Аконита бородатого представляет высокий интерес, так как позволит получить достаточное количество сырья в контролируемых условиях, что является важным преимуществом при получении биологически активных веществ по сравнению с выделением их из малочисленного природного сырья.

Целью данной работы являлось изучение состава дитерпеновых алкалоидов в каллусной культуре *Aconitum barbatum* Patr.

Экспериментальная часть. Культура аконита бородатого получена на кафедре физиологии растений и биотехнологии НИ ТГУ [4, 5].

Выделение суммы алкалоидов из культуры осуществляли последовательной трехкратной экстракцией смесью растворителей этанол: хлороформ (50:50) в щелочной среде [6]. Разделение суммы алкалоидов проводили методом жидкостной колоночной хроматографии (ЖКХ) на сорбенте Sephadex LH-20 и азопоксиадсорбенте Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ [7, 8, 9]. Идентификацию проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах «Sorbfil ПТСХ-АФ-А» (ЗАО Сорбполимер, г. Краснодар). Хроматографировали восходящим способом в подвижной фазе: бутанол: этилацетат (19:1).

Для обнаружения зон адсорбции хроматограммы просматривали в УФ-свете, а так же использовали раствор йодоплатината калия, окрашивающий зоны в коричневый цвет.

Результаты. Сумма алкалоидов выделенных из культуры клеток аконита составила 0,1%. В результате хроматографирования методом ЖКХ модельной смеси алкалоидов на сорбенте Sephadex LH-20 отмечено только два ключевых пика, таким образом, на данном сорбенте не удалось достичь полного разделения исследуемых веществ. Хроматографическое разделение модельной смеси алкалоидов и суммы алкалоидов, выделенных из культуры ткани *Aconitum barbatum* Pers. методом ЖКХ на азоепоксидсорбенте Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ представлено на рисунке 1. В результате хроматографирования наблюдалось наличие шести пиковых фракций, что говорит о полном разделении модельной смеси алкалоидов. Аналогичный результат отмечен при разделении суммы алкалоидов, полученных из культуры ткани (см. рис. 1).

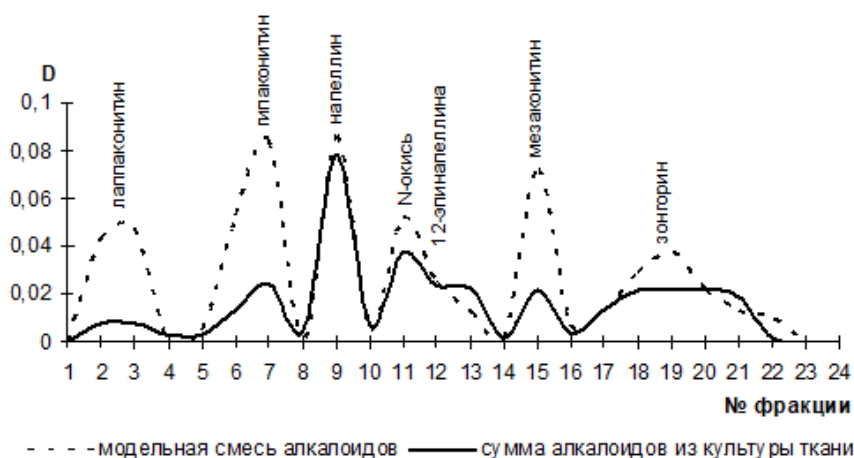


Рис. 1. Хроматографический профиль разделения алкалоидов на азоепоксидсорбенте Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ

УФ-спектры полученных пиковых фракций совпадали с УФ-спектрами стандартных образцов алкалоидов. Результаты идентификации выделенных алкалоидов из культуры ткани *Aconitum barbatum* Pers. методом ТСХ представлены в таблице 1.

Таблица 1

Идентификация алкалоидов методом тонкослойной хроматографии

Стандартные образцы алкалоидов		Фракции после хроматографирования на азоепоксидсорбенте Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ	
стандарт	R _f	№ фракции	R _f
Лаптаконитин	0,65	3	0,65
Гипаконитин	0,75	6	0,75
Напеллин	0,10	9	0,10
N-окись 12-эпинапеллина	0,66	11	0,66
Мезаконитин	0,91	15	0,91
Зонгорин	0,49	20	0,49

Заключение. В результате проведенных исследований доказано воспроизведение суммы алкалоидов в культуре ткани *Aconitum barbatum* Pers. При сравнительном хроматографическом разделении алкалоидов на сорбенте Sephadex LH-20 и азеооксиадсорбенте Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ удалось достичь полного разделения исследуемых веществ только на химически модифицированном аналоге.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mukesh Kr. Singh*, Minu Vinod, Shiv Kr. Iyer, Gaurav Khare, Gotmi Sharwan, Yogesh Kr. Larokar Aconite: A pharmacological update // Pharmascope Foundation International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences – 2012. – Vol – 3. – № 2. – P. 242–246.
2. Li-Mei Sun, Ze-Dong Nan, Hong-Li Huang, Wen-Hai Li, Cheng-Shan Yuan Chemical constituents of *Aconitum barbatum* var. *puberulum* // Chemistry of Natural Compounds. – 2009. – Vol. 45. – № 6. – P. 934.
3. Нестерова Ю.В., Поветьева Т.Н., Суслов Н.И., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Федорова Ю.С., Кульпин П.В., Шапошников К.В. Коррекция холинергических нарушений мнестических процессов дитерпеновым алкалоидом зонгорином // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 165. – № 1. – С. 15–19
4. Пат. РФ № 2631927 Способ получения каллусной культуры борца борогатого (*Aconitum barbatum* Patr. ex Pers.) / М. В Филонова, Ю. В. Медведева, М. В. Ефимова, А. А Чурин; заявитель и патентообладатель НИ ТГУ; Опубл.: 28.09.2017, Бюл. Изобретения полезные модели № 28. – 8 с.
5. Филонова М.В., Филоненко Е.С. Получение каллусной культуры *Aconitum barbatum* Patr. ex Pers. как источника биологически активных веществ // Сборник научных трудов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук», Томск, – 2018. – С. 158.
6. Тайгушанов Б.Ж. Идентификация суммы алкалоидов Аконита борогатого методами ТСХ и ВЭЖХ // В сборнике: Химия и химическая технология в XXI веке материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулёва: в 2 томах. Национальный исследовательский Томский политехнический университет. – 2015. – С. 304–305.
7. Кузнецов П.В., Федорова Ю.С. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. ххvii. к феномену хроматографического разделения фитопрепаратов копеечника забытого на сефадексе LH-20 и его химически модифицированном аналоге // Ползуновский вестник. – 2009. – № 3. – С. 338–339.
8. Федорова Ю.С., Кузнецов П.В., Сухих А.С. Особенности хроматографирования фракций фитопрепарата из копеечника забытого на полисахаридном адсорбенте Сефароза CL-4В // Медицина в Кузбассе. – 2009. – № 7. – С. 72–73.
9. Федорова Ю.С., Сухих А.С., Кузнецов П.В. Ключевые биологически активные вещества фитопрепаратов на основе растений рода копеечник // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. – Т. 11. – № 5. – С. 708–713.

**ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ВВЕДЕНИЕ НОВОГО
ПРОТИВОВИРУСНОГО АГЕНТА КАМФЕЦИНА**О.П. Сальникова

Научный руководитель: доцент, к.б.н. А.В. Фатьянова
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет
Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090
E-mail: lelka515@yandex.ru

**THE STUDY OF THE REACTION OF THE MAMMALS LIVER IN THE INTRODUCTION OF NEW
ANTIVIRAL AGENT CAMPHECIN**O.P.Salnikova

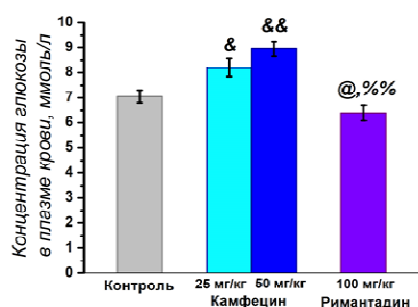
Scientific Supervisor: Associate Professor, Cand. of Biol. A.V. Fatianova
Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogova str, 2, 630090
E-mail: lelka515@yandex.ru

Abstract. *In the present study, we studied the effects of the new antiviral agent camphecine (1,7,7-trimethylbicyclo [2.2.1] heptane-2-ylidene-aminoethanol) on the structure and function of the liver under conditions of dose-dependent and long-term administration in comparison with the most widespread representative of the same mechanism of action, rimantadine.*

Введение. Грипп – острое респираторное вирусное заболевание, этиологически связанное с представителями трех родов из семейства Orthomyxoviridae [1]. Наиболее распространенные серотипы вируса гриппа: А, В и С, из них IAV вызывает сезонные эпидемии с наиболее тяжелым течением у всех видов животных, которые почти каждый год приводят к различным осложнениям и смерти среди человеческой популяции [2]. Для борьбы с возбудителями гриппа человека наиболее часто используют производные адамантана или ингибиторы нейраминидазы. Оба семейства препаратов тормозят развитие вирусной частицы на начальных и поздних стадиях цикла. Однако к производным адамантана, а в частности, к римантадину, из-за его доступности выработалась резистентность у большинства штаммов вируса гриппа человека А [3]. В связи с этим, в НИОХ СО РАН был синтезирован новый противовирусный агент: продукт взаимодействия камфоры и аминоэтанола – 1,7,7-триметилбуйцикло [2.2.1] гептан-2-илиден-аминоэтанол – камфецин. Он показал высокую активность и селективность против штаммов вируса гриппа А - H1N1, H3N2, H5N2 и вируса гриппа В [4], превышая эти показатели в сравнении с римантадином. Как производные адамантана, так и камфецин действуют на ранних стадиях вирусной репликации, блокируя М-протонные каналы в оболочке вируса [5]. В исследованиях 2018 года было показано, что новый противовирусный агент камфецин метаболизируется в печени с образованием трех метаболитов. Часть вещества выводится из организма с мочой без изменений [6]. Исходя из вышесказанного, целью данной работы является изучение функциональных и структурных особенностей реакции печени крыс в условиях введения нового противовирусного агента камфецина в сравнении с наиболее широко изученным препаратом того же механизма действия римантадином.

Экспериментальная часть. Для изучения эффектов, оказываемых новым противовирусным агентом камфецином, была выполнена работа, позволяющая сравнить уровни воздействия изучаемого лекарственного агента в условиях введения его в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг в течение 5 суток. Эксперименты выполнены на крысах линии WAG с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Агенты вводили внутривенно четырем группам животных один раз в сутки в течение 5 дней в дозировках: камфецин – 25 мг/кг, камфецин – 50 мг/кг, римантадин – 100 мг/кг, в качестве растворителя использовали физиологический раствор и 20 мкл твин-80. Контрольным животным вводился физиологический раствор с 20 мкл твин-80 в течение 5 суток внутривенно. Проведено гистохимическое исследование строения печеночных долек, гепатоцитов и соединительной ткани с использованием следующих окрасок: гематоксилин-эозин, по Маллори и ШИК-реакцией. Осуществлен анализ концентрации глюкозы, активностей АЛТ и АСТ в плазме крови с использованием биохимических методик. Препараты изучали под световым микроскопом Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива x20, x40, x63. Снимки препаратов выполнены с использованием цифровой фотонасадки AxioCam MRc (Carl Zeiss, Германия). Достоверность различий между группами оценивали по t-критерию Стьюдента для независимых выборок с использованием пакета программ Statistica 8.0. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Глюкоза является легкоусвояемым углеводом, синтез которого происходит в гепатоцитах. В ходе экспериментов получено достоверное увеличение концентрации глюкозы в группах камфецина (25 и 50 мг/кг) в сравнении как с группой контроля, так и с группой римантадина (Рис. 1). В случае гепатоцеллюлярного повреждения или смерти, высвобождение АЛТ из поврежденных клеток печени увеличивает измеренную активность АЛТ в сыворотке крови. Уровень активности АЛТ в группе римантадина достоверно выше, чем в группе контроля и группах камфецина (Рис. 2). Достоверных различий уровней активности АСТ и ГГТ между группой контроля и лекарственными группами выявлено не было (Рис.3).



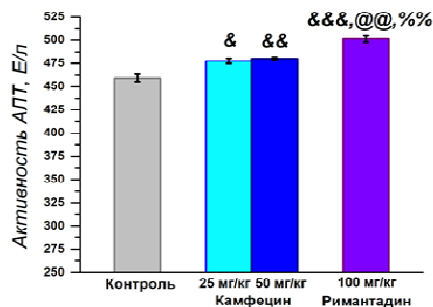
& $p < 0,05$ по сравнению с контролем,
 && $p < 0,01$ по сравнению с контролем
 @ - по сравнению с камфецином-25,
 % - по сравнению с камфецином-50

Рис. 1. Концентрация глюкозы в плазме крови

При морфологическом исследовании выявлены тенденции увеличения количества многоядерных гепатоцитов и телец апоптоза в лекарственных группах по сравнению с контрольной вне зависимости от условий введения.

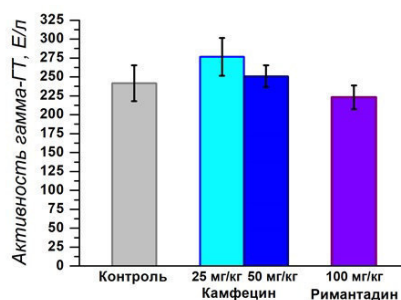
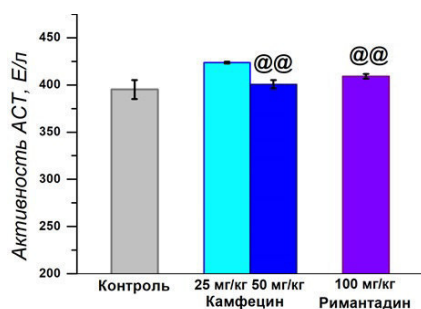
Выводы. В проведенных исследованиях выявлено гипергликемический эффект камфецина вне зависимости от вводимой в течение 5 суток дозировки, не характерный для группы римантадина, а так

же, более деликатный эффект нового противовирусного агента на паренхиму печени, на что указывает снижение активности АЛТ в сравнении с группой римантадина.



& $p < 0,05$ по сравнению с контролем,
 && $p < 0,01$ по сравнению с контролем
 &&& $p < 0,001$ по сравнению с контролем
 @ - по сравнению с камфецином-25,
 % - по сравнению с камфецином-50

Рис.2. Активность АЛТ в плазме крови



@@ $p < 0,01$ по сравнению с камфецином-25

Рис.3. Активность АСТ и ГГТ в плазме крови

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каверин Н.В., Львов Д.К. Ортомиксовирусы (Orthomyxoviridae). В кн.: Медицинская вирусология. Рук-во. Ред.: академик РАМН Д. К. Львов. – М.: МИА, 2008. – С. 176–183.
2. Liu M., Zhao X., Hua S., Du X., Peng Y., Li X., Lan Y., Wang D., Aiping W. Antigenic Patterns and Evolution of the Human Influenza A (H1N1) Virus // Scientific Reports. – 2015 – 5:14171.
3. Fiore A.E., Fry A., Shay D., Gubareva L., Bresee J.S., Uyeki T.M. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza – recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR. // Recommendations and Reports. – 2011. – № 60 – P. 1-24.
4. Пат. 2530554 РФ. Применение 1,7,7 – триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден-аминоэтанола в качестве ингибитора репродукции вируса гриппа / О.И. Яровая, А.С. Соколова, Т.С. Третьяк, В.В. Зарубаев, О.И. Киселев, Н.Ф. Салахутдинов. Заявлено 22.04.2013; Опубл. 10.10.2014, Бюл. № 28.
5. Zarubaev V.V., Garshinina A.V., Tretiak T.S., Fedorova V.A., Shtro A.A., Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Salakhutdinov N.F. Discovery of a new class of antiviral compounds: Camphor imine derivatives // European J. of Medicinal Chemistry. – 2015. – № 105. – P. 263-273
6. Rogachev A.D., Yarovaya O.I., Fatianova A.V., Lavrinenko V.A., Amosova E.V., Zarubaev V.V., Pokrovsky A.G., Salakhutdinov N.F. Untargeted search and identification of metabolites of antiviral agent camphocene in rat urine by liquid chromatography and mass spectrometry and studying their distribution in organs following peroral administration of the compound // J. of Pharm. and Biomedical Analysis. – 2018. – №161. – P. 383–392.

ПОИСК МАРКЕРОВ АГРЕССИВНОСТИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ РАЗНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

Е.И. Семина, Т.С. Калинина

Научные руководители: профессор, д. б. н. Л.Ф. Гуляева, профессор, д. м. н. С.П. Шевченко

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,

Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1, 630090

E-mail: e.semina@g.nsu.ru

SEARCH FOR AGGRESSIVENESS MARKERS OF SKIN MELANOMA WITH DIFFERENT LOCALISATION

E.I. Semina, T.S. Kalinina

Scientific Supervisors: Prof., Dr. L.F. Guliaeva, Prof., Dr. S.P. Shevchenko

Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogov str., 1, 630090

E-mail: e.semina@g.nsu.ru

Abstract: Skin melanoma is an extremely aggressive tumor. By the last 10 years the incidence of melanoma has doubled. Mutations in BRAF and NRAS genes are supposed to be aggravate the course of melanoma. So these genes are probable markers of tumor aggressiveness. In present study we studied the relationship between melanoma localization, its aggressiveness and the presence of mutations in BRAF and NRAS genes. To study aggressiveness, the retrospective analysis of clinical records was performed. For mutation research DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue and analyzed by the allele-specific PCR method. 12 patients with head and neck skin melanoma and 14 patients with skin melanoma of other localization were examined. 33% and 14% of them had tumor relapse, respectively. During the study, mutations of BRAF gene were found in 33% of head and neck skin melanoma and in 11% of skin melanoma with other localization. Mutations of NRAS gene were found only in 17% of head and neck skin melanoma. Patients with skin melanoma localized on the body for whom a mutation was detected in the BRAF gene, had more than two prognostically unfavorable factors. For patients with melanoma of the head or neck it is not possible to check whether the mutations are associated with the aggressiveness of the disease. However, the data indicate a high mutation rate for this melanoma, which is considered to be a more aggressive form of cancer than skin melanoma of other organs. To confirm the association of mutations in the BRAF and NRAS genes with aggressiveness of skin melanoma, further research is needed.

Введение. Меланома кожи (МК) – опасное заболевание, занимающее первое место по уровню смертности среди злокачественных заболеваний кожи. Значительные опасения вызывает наблюдаемый ежегодный прирост случаев заболевания меланомой, который составляет 4–5% и является одним из самых высоких среди всех злокачественных опухолей [1].

К факторам риска возникновения меланомы кожи относят физическое воздействие: ультрафиолетовое излучение, повреждение невусов, ионизирующую радиацию; и биологические особенности организма: светлую кожу, перенесенные инфекционные заболевания, генетическую предрасположенность [2].

Меланома может локализоваться на любом участке тела, однако клиническая практика показывает, что опухоли на голове и шее имеют более агрессивное течение, чем меланомы на других участках тела [3], что может быть связано с различными факторами. Так, например, участки кожи на голове и шее сильнее подвержены инсоляции и другим повреждающим факторам.

Поскольку ультрафиолетовое излучение приводит к возникновению мутаций в генах, среди которых могут быть онкогены или гены-супрессоры опухолей, можно предположить, что появление таких мутаций является одной из причин более агрессивного течения заболевания на голове и шее.

Наиболее интересными с точки зрения прогноза течения меланомы кожи являются мутации в генах *BRAF* и *NRAS*. Показано, что данные мутации связаны с неблагоприятным прогнозом при раке щитовидной железы [4] и колоректальном раке [5,6]. Белки *BRAF* и *NRAS* (продукты соответствующих генов) регулируют процесс пролиферации клетки. При утрате функции данных белков правильная пролиферация клетки нарушается, и происходит малигнизация [7].

В связи с этим в данной работе исследовалась связь между локализацией меланомы и наличием мутаций в генах *BRAF* и *NRAS*, белковые продукты которых регулируют пролиферацию меланоцитов.

Материалы и методы. Образцы тканей были получены в VI и II онкологических отделениях ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 1». Для подтверждения того, что агрессивность заболевания зависит от локализации меланомы, проводился ретроспективный анализ историй болезни пациентов.

В опытную группу было набрано 12 пациентов с меланомой кожи на голове и шее, в контрольную – 14 пациентов с меланомой кожи на других участках тела. Всем пациентам было проведено широкое иссечение опухоли в пределах здоровых тканей и гистологически подтвержден диагноз «меланома кожи».

Выделение ДНК производилось из срезов тканей, фиксированных в парафине, согласно рекомендациям производителя набора для выделения ДНК из парафиновых блоков «FFPET DNA – Extraction Kit #31901» (БиоЛинк, Россия). Наличие ДНК в растворе подтверждалось контрольной ПЦР согласно протоколу производителя набора «Real-time-PCR-BRAF-V600E #21702» (БиоЛинк, Россия).

Для выявления мутаций в генах *BRAF* (V600E) и *NRAS* (12-13G и 61Q) применялся метод аллель-специфичной ПЦР. Процедура определения проводилась согласно протоколам производителя наборов для проведения аллель-специфичной ПЦР «Real-time-PCR-BRAF-V600E #21702» (БиоЛинк, Россия), «Real-time-PCR-NRAS-3R #21552» (БиоЛинк, Россия). Для подавления ингибирования ПЦР меланином добавляли раствор БСА до конечной концентрации 0,6 мкг/мл [8].

Анализ экспериментальных данных проводился в программе Microsoft Excel. Образец ДНК считался несущим мутацию, если $dCt_{\text{образца}} < dCt_{\text{положительного стандарта}}$. В качестве положительного стандарта использовался раствор, содержащий 1% ДНК-копий *BRAF* с мутацией V600E или 5% ДНК-копий *NRAS* с мутациями 12-13G или 61Q на фоне ДНК человека без мутаций гена. В качестве отрицательного ДНК стандарта использовался раствор, содержащий ДНК человека без мутаций в исследуемых генах.

Результаты. Было показано, что меланома кожи с локализацией на голове и шее действительно протекает агрессивнее: пациенты с МК такой локализации в 2,3 раза чаще обращаются с рецидивами или прогрессированием заболевания, чем пациенты с МК на других участках тела.

Мутация в гене *BRAF* была выявлена у 33% пациентов с меланомой кожи на голове и шее и у 11% пациентов с данным заболеванием другой локализации. Мутация 12-13G в гене *NRAS* была обнаружена у 17% пациентов с меланомой кожи на голове и шее, у пациентов с МК на теле не было обнаружено мутаций в этом гене (Табл. 1).

Таблица 1

Результаты исследования мутаций генов *NRAS* и *BRAF* в клетках меланомы кожи

Локализация	Доля пациентов, у которых выявлены мутации		
	<i>NRAS</i> 12G-13G	<i>NRAS</i> 61Q	<i>BRAF</i> V600E
Голова-шея	17%	0	33%
Тело	0	0	11%

При этом у пациентов, у которых была обнаружена мутация в гене *BRAF* при меланоме кожи, локализованной на теле, было выявлено наличие более двух прогностически неблагоприятных факторов (толщина опухоли по Breslow > 4 мм, изъязвление на поверхности опухоли, мужской пол). В случае с МК головы или шеи сложно сделать вывод о связи мутаций с агрессивностью течения заболевания, так как эти пациенты обращались на ранних стадиях. Однако полученные данные уже указывают на высокую частоту мутаций при данной МК, которая считается более агрессивной формой рака, чем МК других органов.

Выводы. Полученные результаты подтверждают тот факт, что для меланомы кожи с локализацией на голове и шее характерна высокая частота мутаций, что особенно важно при выборе стратегии лечения. Однако для подтверждения связи мутаций в генах *BRAF* и *NRAS* с агрессивным течением МК требуется дальнейшее исследование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michael Sand MicroRNAs in malignant tumors of the skin. – Wiesbaden: Springer Nature, 2016. – С. 7.
2. Меланома кожи / С.П. Шевченко, Е.В. Карпинская, под ред. С.В. Исакова, – Новосибирск: РИЦ НГУ, 2010. – 40 с.
3. Zito PM, Scharf R. Cancer, Melanoma, Head And Neck. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513248/> (дата обращения 26.02.2019).
4. Cercek A., Braghiroli M., Chou J. (2017). Clinical Features and Outcomes of Patients with Colorectal Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. № 16 (23). pp. 4753–4760.
5. Mitani S., Taginuchi H., Sugiyama K. (2019). The impact of the Glasgow Prognostic Score on survival in second-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer patients with *BRAF* V600E mutation. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. Vol. 11. pp. 11.
6. Rebersek M. Mesti T., Boc M. (2019). Molecular biomarkers and histological parameters impact on survival and response to first- line systemic therapy of metastatic colorectal cancer patients. *Radiology and Oncology*. № 1 (53). pp. 85–95.
7. Eckhart L., Bach J., Ban J. (2000) Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. Vol. 271, № 3. pp. 726–730.
8. Меланома / [Л.Ф. Гуляева и др.], под ред. А.В. Грасмик. – Новосибирск: РИЦ НГУ, 2015. – 55 с.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ
МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ ГИДРОКСИАПАТИТОВ IN VITRO**

Д.А. Федоришин, А.А. Шнайдемиллер, Н.М. Коротченко

Научный руководитель: профессор, д.ф.-м.н. И.А. Курзина

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

E-mail: strix187@yandex.ru

**EXPERIMENTAL STUDY OF ANTI-MICROBIAL ACTIVITY OF CUPRUM-CONTAINING
HYDROXYAPATITIS IN VITRO**

D.A. Fedorishin, A.A. Sneightmiller, N.M. Korotchenko

Scientific Supervisor: Prof., Dr. I.A. Kurzina

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

E-mail: strix187@yandex.ru

***Abstract.** Hydroxyapatite based composites are promising materials for bone implants. One of the important properties of such biomaterials is the ability to suppress the vital activity of microorganisms that fall into the wound during surgery. The aim of this study was to examine anti-microbial activity of cuprum-containing hydroxyapatitis in vitro. Antimicrobial activity studied to suppress the growth of Escherichia coli. As a result, it found that all the samples of hydroxyapatites inhibited the growth of Escherichia coli. We can conclude that all samples have pronounced antimicrobial activity.*

Введение. В настоящее время особо актуальным направлением исследований является создание и изучение биосовместимых материалов для костных имплантатов. Эти материалы представляют собой биокompозиты различного химического состава и строения. Важным преимуществом этих материалов перед классическими материалами для искусственных костных имплантатов является биохимическая совместимость, выражаемая в меньшей интенсивности воспалительных реакций в окружающих имплантат тканях. Разрабатываются новые биосовместимые композитные материалы на основе модифицированного гидроксиапатита, который обладает всеми свойствами, необходимыми для применения его в качестве минерального компонента биокompозитов [1]. Наиболее значимыми из этих свойств являются близкие к прочности кости механические характеристики, способность к биодеградации, а также низкая провоспалительная активность. Модифицированные ионами металлов гидроксиапатиты являются основными неорганическими компонентами костной ткани, разрешенными для использования в качестве компонентов для биокompозитов и покрытий для хирургических имплантатов. Данные материалы инертны к живым тканям и малотоксичны. Также при их применении вероятность аллергических реакций, воспалений, мутагенного действия довольно низка. Также модифицированные гидроксиапатиты могут ускорять процесс репаративного остеогенеза в месте имплантации и усиливать пролиферацию остеобластов [1].

Одним из важных свойств гидроксиапатита является способность подавлять рост и развитие бактерий, попадающих в рану при операции. Бактерии, попавшие в рану в процессе хирургической

операции при проведении остеосинтеза могут вызывать внутрибольничные и параимплантарные инфекции. Возникновение подобных инфекций значительно снижает качество жизни пациента и приводит к необходимости повторных оперативных вмешательств с непредсказуемыми последствиями. Кроме того, при этом существенно возрастает риск осложнений, могущих привести к инвалидизации больного. Поэтому изучение антимикробной активности биосовместимых материалов является очень перспективным направлением исследований [1].

Цель работы заключается в изучении антимикробной активности образцов модифицированного гидроксиапатита с различным мольным содержанием ионов меди (CuГА) [2]. Выбор данного металла для модифицирования гидроксиапатитов был обусловлен тем, что ионы меди обладают ярко выраженными антибактериальными свойствами [1].

Материалы и методика исследования. Для получения образцов CuГА и установления их свойств в зависимости от степени содержания ионов Cu^{2+} был проведен жидкофазный СВЧ-синтез образцов с различным содержанием данных ионов; мольная доля Cu^{2+} в исследованных образцах составила $x = 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9$. Методом рентгенофазового анализа было установлено, что основной фазой порошков является гидроксиапатит, который образует твердые растворы замещения с ионами меди(II).

Всего было протестировано 5 образцов CuГА. В качестве тест-системы были использованы бактерии *Escherichia coli* штамма ATCC 25922 (American Type Culture Collection). Для изучения свойств образцов было применено определение количества клеток высевом на плотные питательные среды (метод Коха). Эксперимент проведен в 1-й повторности (1 образец – 1 колба) с каждым образцом. Среда для культивирования кишечной палочки представляла собой стандартную для данных бактерий – среду LB состава: пептон (10 г/л), дрожжевой экстракт (5 г/л), хлорид натрия (10 г/л), агар микробиологический (1,5-2% от объема). Инкубирование производилось в термостате в колбах Эрленмейера на 250 мл, со 100 мл среды LB при температуре 37-38 °С. В качестве контроля использовался посев бактерий на стандартную среду LB, не содержащую образцов [3].

Каждый образец массой 0,8 г помещен в колбу с расплавленной твердой питательной средой LB и простерилизован в автоклаве при 1 атм и 120 °С в течение 30 мин. Всего подготовлено 6 колб с твердой питательной средой: № 1 – без добавления образца для контроля и №№ 2-6 – для CuГА с различным мольным содержанием ионов меди ($x = 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9$ соответственно). После этого 1 мл жидкой маточной культуры бактерий переносили в пробирку с 9 мл 0,9 %-го раствора NaCl и ресуспендировали. Затем 1 мл данного раствора переносили в следующую пробирку с физиологическим раствором и так далее до получения 5-го разведения маточной культуры. Высев бактерий на питательные среды, содержащие образцы, был произведен из 3, 4 и 5 разведений. Инкубирование проводили в термостате в течение 24 часов при температуре 37-38 °С. Спустя 24 часа проведен учет количества выросших бактериальных колоний на плотной питательной среде в чашках Петри диаметром 60 мм.

Результаты. Результаты, полученные в ходе анализа наличия бактерицидной активности образцов, показывают, что все представленные в исследовании образцы обладают значительной антимикробной активностью, существенно подавляют рост и развитие кишечной палочки. При этом на рисунке 1 указаны данные только по образцу CuГА ($x = 0,1$). Это связано с тем, что в чашках с остальными образцами гидроксиапатита ($x = 0,3; 0,5; 0,7; 0,9$) не было обнаружено никакой микрофлоры.

Их антимикробная активность оказалась настолько высока, что все внесенные в чашки Петри бактерии погибли.

Отдельно следует отметить, что в чашке с образцом СиГА ($x = 0,1$) размеры колонии бактерий были несколько меньше по сравнению с контролем. Обнаружено, что рост колоний и увеличение их в размерах также были несколько меньше по сравнению с контрольным образцом. При этом данные колонии появились несколько позже аналогичных в контроле.

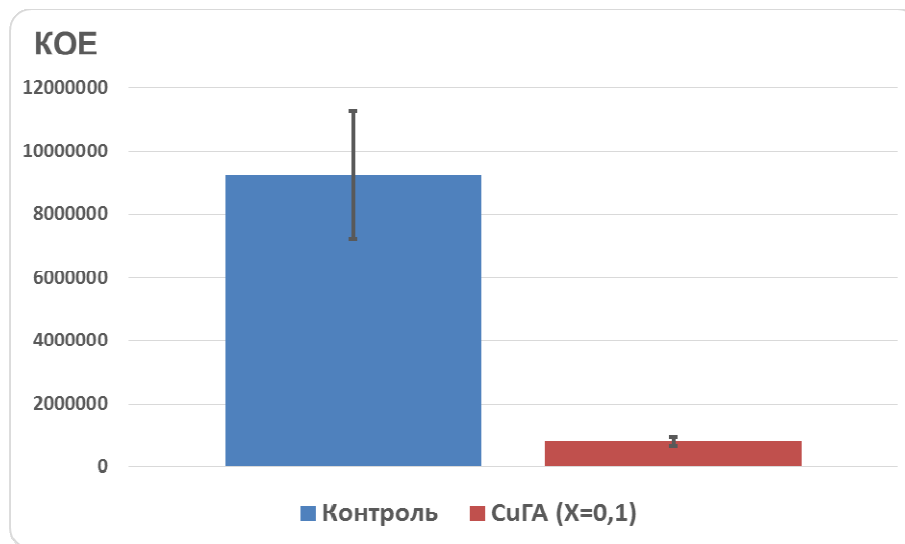


Рис. 1 Численность тест-образца (*E. coli*) в разных вариантах эксперимента ($p < 0,05$).
 Результаты учета микроорганизмов показаны только для образца СиГА ($x = 0,1$) по причине отсутствия микрофлоры в чашках с иными образцами

Заключение. Таким образом, все исследованные образцы гидроксиапатита с включенными в состав ионами меди обладают бактерицидным действием, снижая численность кишечной палочки. Посторонней микрофлоры на питательной среде не выявлено: все колонии были однотипными и по морфологическим признакам отнесены к исследуемому текст-объекту. Колоний, имеющих постороннюю морфологию, на чашках Петри не было обнаружено.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (номер проекта 17-03-00698).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шпиняк С.П. Экспериментальное исследование антимикробной активности гидроксиапатита и наночастиц металлов *in vitro* // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6. - С. 75–84.
2. Рассказова Л.А. СВЧ-синтез гидроксиапатита и физико-химическое исследование его свойств // Журнал прикладной химии. – 2013. – Т. 86. – № 5. – С. 744–748.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012.

**ВЛИЯНИЕ РАКА ЛЕГКОГО НА M1/M2 ПОЛЯРИЗАЦИЮ МАКРОФАГОВ,
ИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

А.А. Федоров, В.А. Попова

Научный руководитель: д.м.н. М.Н. Стахеева

Научно-исследовательский институт онкологии томского национального исследовательского

медицинского центра Российской академии наук

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

E-mail: anton.fedorov.2014@mail.ru

**EFFECT OF LUNG CANCER ON M1 / M2 POLARIZATION OF MACROPHAGES IDENTIFIED
FROM PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES**

A.A. Fedorov, V.A. Popova

Scientific adviser: Ph. D.M.N. Staheeva

Scientific Research Institute of Oncology of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy
of Sciences Russian, Russian, Tomsk, Savinykh st. 12/1, 634028

E-mail: anton.fedorov.2014@mail.ru

***Abstract.** Tumor-associated macrophages are representatives of the final stage of differentiation of monocyte-macrophage lineage. Their properties are determined by the tissue environment mainly, including the biological features of malignant tumors. The purpose of this study is to compare the ability of peripheral blood monocytes in healthy individuals and in patients with lung cancer to M1 and M2 polarization on exposure to LPS and IL-4. As a result of this study, we found out that macrophages induced from monocytes of peripheral blood in patients with lung cancer are less capable of functional polarization and are characterized by changes in the subpopulation structure in response to the inducing effects of IL-4 and LPS compared to healthy individuals. The influence of the tumor is one of the probable factors determining the change in the properties of cells of the monocyte-macrophage lineage. One of the likely factors determining the change in the properties of cells of the monocyte-macrophage series is the influence of the tumor. Designing new therapies, directing development of monocytes toward M1 activated tumor macrophages in cancer patients, may have great clinical benefits.*

Введение. Фенотип тканевых макрофагов подвержен изменениям в результате действия определенных сигналов, производимых опухолевым микроокружением, что приводит к формированию популяции макрофагов, ассоциированных с опухолью (МАО) [1]. При этом МАО способны иметь различный фенотип: в опухоли отмечены как М1, так и М2-поляризованные типы [2,3]. Если популяция МАО, поляризованных по типу М1, подавляет ангиогенез новообразования и повышает чувствительность опухолевых клеток к цитостатическим воздействиям, то М2-МАО способствуют росту опухоли [4]. При этом количество М1-МАО положительно коррелирует с лучшей выживаемостью при многих злокачественных новообразованиях, в отличие от М2-МАО [5]. В настоящее время показана ключевая роль макрофагов, ассоциированных с опухолью (МАО), для патогенеза злокачественного роста и, в частности, для опухолей легкого [6]. Целью данной работы является сравнение способности

моноцитов периферической крови у здоровых лиц и у больных раком легкого (РЛ) к М1 и М2 поляризации при воздействии ЛПС и ИЛ-4.

Экспериментальная часть. В контрольную группу вошли практически здоровые волонтеры (n=14). Средний возраст группы составил 33 года (от 23 до 52 лет). В исследовательскую группу вошли 4 пациента с диагностированным центральным раком легкого (РЛ) на этапе до начала лечения. В качестве материала исследования выступала гепаринизированная кровь, которую в соотношении 1:1 смешивали со средой для отмывки, состоявшей из среды RPMI-1640 (Invitrogen). Полученную смесь в количестве 30 мл наслаивали на 15 мл фиколла (Amersham) и центрифугировали при 1600 оборотах в минуту без встряхивания в течение 45 минут при 22°C. Затем полученное интерфазное кольцо, содержащее фракцию моноцитов и лимфоцитов, аккуратно собирали при помощи пастеровской пипетки и дважды отмывали средой для отмывки при 1200 оборотах в минуту в течение 15 минут при 4°C. Отмытые мононуклеарные клетки разводили в полной культуральной среде до концентрации 2×10^6 клеток/мл (среда DMEM, L-глутамин, пенициллин и стрептомицин, 10 % термически инактивированной фетальной сыворотки теленка (Sigma)). Мононуклеарные клетки в объеме 1 мл полной культуральной среды помещали в 24-луночный плоскодонный планшет для культивирования клеток (Greetmed). Для каждого исследования ставились 3 пробы: 1 – контрольная проба, 2 – проба для индукции М1-макрофагов, 3 – проба для индукции М2-макрофагов. Во все лунки добавляли стимулятор макрофагального роста колониестимулирующий фактор макрофагов (М-КСФ) в дозе 20 нг/мл. Через 5 суток инкубации клеток в атмосфере 5% CO₂ во вторую и третью пробы добавляли 100 нг/мл липолисахарида (ЛПС, Sigma) или 10 нг/мл интерлейкина-4 (ИЛ-4, Sigma) соответственно. Через 24 часа инкубации фракцию прилипших клеток – макрофагов – отделяли от дна лунки скрепером, собирали в пробирки с полной культуральной средой, фиксировали, а затем окрашивали для исследования индуцированного фенотипа макрофагов. Фенотипические особенности популяции индуцированных из моноцитов макрофагов были изучены методом проточной цитофлуориметрии. Статистическая обработка данных осуществлялась в пакете программ «Statistica», версия 6.1. Проверку выборки на нормальность осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка, так как объем выборки недостаточно велик для использования критерия Колмогорова-Смирнова. Полученные данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (LQu-UQu). Для оценки различий между показателями контрольной группы и показателями группы больных РЛ, использовался критерий Манна - Уитни.

Результаты. Добавление в культуру моноцитов/макрофагов индуктора М2-поляризации ИЛ-4 у здоровых лиц сопровождалось значимым увеличением популяции М2-поляризованных макрофагов, экспрессирующих CD206 молекулу (42,7; 9,2-57,1 % в сравнении с 34,2; 4,5-42,6 % без индуцирующего воздействия, $p < 0,05$). Популяция, экспрессирующая другой маркер М2-поляризации клеток моноцитарно-макрофагального ряда CD163, была снижена относительно фоновых значений (0,2; 0,1-1,8 % в сравнении с 1,0; 0,4-3,3 % без индуцирующего воздействия, $p < 0,05$). У здоровых лиц также было отмечено увеличение количества макрофагов, экспрессирующих маркер миелоидных клеток-супрессоров CD15 (36,6; 20,3-49,0% в сравнении с 32,5; 15,7-38,6 % без индуцирующего воздействия, $p < 0,05$). Макрофаги больных РЛ в значительно меньшей степени ответили на поляризующее воздействие ИЛ-4. При этом не было отмечено увеличения М2-популяций, экспрессирующих как CD163 (0; 0-0,6 % в сравнении с 0,1; 0-0,6 % без индуцирующего воздействия), так и CD206 маркеры (7,4; 1,3-17,0 % в

сравнении с 10,0; 1,9-13,2 % без индуцирующего воздействия). ИЛ-4 также не оказал влияния на генерацию популяции CD15+ миелоидных клеток-супрессоров (0,4; 0,3-0,5 % в сравнении с 0,5; 0,1-0,6 % без индуцирующего воздействия). Добавление ЛПС - индуктора M1-поляризации моноцитов/макрофагов в культуру клеток у здоровых лиц приводило к значимому снижению популяции клеток, экспрессирующих маркеры M2-поляризации CD163 и CD206, при этом увеличивалась CD68+163- популяция макрофагов, не имеющих данных маркеров на своей поверхности ($p < 0,05$). Добавление на 5 сутки культивирования ЛПС в культуру макрофагов, индуцированных из моноцитов ПК у больных РЛ, сопровождалось определенными признаками M1-поляризации, что выражалось в снижении медианы интенсивности флюорисценции (MFI) маркера CD206 (фоновое значение 13300; 9270-31000 против 13084; 7350-19000 при добавлении ЛПС) косвенно отражающей плотность данного рецептора на поверхности клеточной мембраны. Однако другие признаки M1-поляризации, такие как увеличение CD163-отрицательной популяции и снижение CD163-положительной популяции, отмеченные у здоровых лиц, у пациентов с РЛ отмечены не были. Кроме того, макрофаги, полученные из моноцитов больных РЛ при стимуляции ЛПС, характеризовались увеличением CD14+, CD15+, CD16+ и CD45+ популяций клеток в отличие от индивидов без онкологического заболевания.

Заключение. Основываясь на оценке выбранных маркеров, следует заключить, что макрофаги, индуцированные из моноцитов ПК здоровых лиц, при применении ЛПС и ИЛ-4 в качестве индукторов достигают M1 и M2 поляризации соответственно. Макрофаги, индуцированные из моноцитов ПК у больных РЛ в сравнении с показателями у здоровых лиц, в меньшей степени способны к функциональной поляризации и характеризуются изменениями субпопуляционной структуры в ответ на индуцирующие воздействия как ИЛ-4, так и ЛПС. Одним из вероятных факторов, определяющих изменение свойств клеток моноцитарно-макрофагального ряда, является влияние опухоли.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chung F.T, Lee K.Y., Wang C.W. et al. Tumor-associated macrophages correlate with response to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer // *International Journal of Cancer*. – 2012. – Vol. 3. – P. 227-235.
2. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation // *Nature Reviews Immunology*. – 2008. – Vol. 12. – P. 958-969.
3. Takeya M., Komohara Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe? // *International Journal of Surgical Pathology*. – 2016. – Vol. 9. – P. 491-505.
4. Almatroodi S.A., McDonald C.F., Darby I.A., Pouniotis D.S. Characterization of M1/M2 Tumour-Associated Macrophages (TAMs) and Th1/Th2 Cytokine Profiles in Patients with NSCLC // *Cancer Microenvironment*. – 2016. – Vol. 1. – P. 1-11.
5. Ohri C.M., Shikotra A., Green R. H. et al. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival // *European Respiratory Journal*. – 2009. – Vol. 1. – P. 118-126.
6. Ostuni R., Kratochvill F., Murray P.J., Natoli, G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications // *Trends in Immunology*. – 2017. – Vol. 36. – P. 229-239.

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ И
ТОКСИЧНОСТИ РИАМИЛОВИРА НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ IN SILICO И IN VITRO/IN
VIVO**

К.Д. Федулова

Научный руководитель: доцент, д.м.н. Н.В. Изможерова

Уральский государственный медицинский университет,

Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина 3, 620014

E-mail: fedulova.k.d@gmail.com

**COMPARATIVE STUDY OF PHARMACOKINETIC PARAMETERS AND TOXICITY OF
RIAMILOVIR ON THE BASIS OF DATA IN SILICO AND IN VITRO / IN VIVO**

K.D. Fedulova

Scientific Supervisor: Dr. N.V. Izmozherova

Ural State Medical University, Russia, Ekaterinburg, Repina str. 3, 620014

E-mail: fedulova.k.d@gmail.com

Abstract. *Antiviral drug riamilovir has undergone all stages of preclinical studies and is currently used to treat type A and B influenza, also is still continuing research on antiviral activity against other respiratory viruses and tick-borne encephalitis, as well as existing theoretical data on possible antiviral effect against other RNA-containing viruses. To provide optimal drug safety profile it's necessary more data on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. Computer virtual screening is one of the tools for the comprehensive study of drug substances. The purpose of the research was to compare the pharmacokinetic parameters and the acute toxicity of riamilovir obtained in vivo / in vitro and in silico. To predict acute toxicity and pharmacokinetics, the admetSAR 2.0 web service was used. For comparing was used data from reviews on the acute toxicity and pharmacokinetics of riamilovir which was studied in vivo and in vitro. According to in silico screening and experimental studies, riamilovir is shown to be of low toxicity; novel data of pharmacokinetic parameters of riamilovir received during in silico screening presented in the current report.*

Введение. Изучение Риамиловира (название по ИЮПАК: 2-метилсульфанил-6-нитро[1,2,4]триазоло[3,1-с][1,2,4] триазин-7(4Н)-один; торговое название: Триазавирин[®]) проводится с 80х годов, он относится к гетерогенной группе соединений на основе азоло[3,1-с][1,2,4]триазинов. Данный препарат прошел все этапы доклинического исследования токсичности: in vivo и in vitro. По их результатам были получены данные о малотоксичности данного препарата [1].

Неэкспериментальная оценка токсичности и фармакокинетических параметров in silico основывается на компьютерных алгоритмах, которые учитывают химическую структуру и активность лекарственного вещества. Токсикологические исследования in silico представляют собой интеграцию современных компьютерных и информационных технологий и молекулярной биологии для повышения качества оценки риска при применении химических веществ (Агентство по охране окружающей среды США, US EPA, 2003) [2].

Данные полученные на этапах *in vitro* и *in vivo* исследований не могут быть экстраполированы полностью на человека, поскольку имеют широкую вариабельность, в связи с технологическими и биологическими особенностями [3]. Результаты исследований токсичности *in silico* так же имеют свои ограничения, но в то же время могут предоставить дополнительные данные, поскольку возможно одномоментное моделирование большого количества фармакокинетических и фармакодинамических параметров. Вопрос о сопоставлении данных *in vitro*, *in vivo* и *in silico* остается дискуссионным.

Экспериментальная часть. По данным литературы экспериментальная оценка токсичности проводилась *in vitro* (канцерогенность оценивалась на гепатоцитах и альвеолярном эпителии легких мышей линии СВА, мутагенность на культуре Salmonella), *in vivo* – оценивалась фармакокинетика (абсорбция, распределение, период полувыведения, биодоступность), в качестве животных моделей использовались нелинейные крысы и кролики, острая токсичность (степень токсичности, среднесмертельная доза LD₅₀) при внутрижелудочном введении препарата.

Прогноз токсичности *in silico* проводился при помощи веб-сервиса admetSAR 2.0 [4]. Для проведения моделирования использовалась молекула в формате SMILES из открытой базы данных PubChem Национального института здоровья США: CSc1[nH]n2c(=O)c(nnc2n1)[N+](=O)[O-].

Для сравнительной оценки были выбраны следующие параметры: биодоступность, прохождение через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), кишечная абсорбция, тест Caco2 проницаемости, период полувыведения, субстрат и ингибитор Р-гликопротеина, ингибитор почечного органического катионного транспортера (ROCT) и гена, кодирующего калиевые каналы (Human Ether-a-go-go Related Gene Human Ether-a-go-go Related Gene, hERG), субстрат и ингибитор системы цитохрома CYP450, тест Эймса, канцерогенность, среднесмертельная зона LD₅₀, классификация по степени токсичности.

Результаты. Данные литературы о токсичности и фармакокинетике риамиловира, полученные *in vivo/in vitro* были сопоставлены с результатами, полученными *in silico*. (см. таблицу 1).

Таблица 1

Сравнение фармакокинетических параметров и параметров токсичности, полученных в исследованиях *in vitro/in vivo* и *in silico*

Параметр	Исследования <i>in vitro/in vivo</i>	Исследование <i>in silico</i>
Фармакокинетические параметры		
Биодоступность	20%	нет данных
Проникает через ГЭБ	+, плохо	+
Кишечная абсорбция	+	+
Тест Caco2 проницаемости	нет данных	-
Период полувыведения	1,19-1,36 ч	нет данных
Субстрат или ингибитор для Р-гликопротеина	нет данных	-
Ингибитор ROCT	нет данных	-
Субстрат и ингибитор CYP 450 (2C9, 2D6, 3A4)	нет данных	-
Ингибитор hERG	нет данных	-
Параметры токсичности		
Тест Эймса	-	+
Канцерогенность	-	-

Среднесмертельная доза	8100-9500 мг/кг	565,9 мг/кг
Категория/степень токсичности	5 степень по Hodge и Sterner	III категория (по US EPA)
«нет данных» - данный параметр не оценивался, «-» - отрицательный результат, «+» - положительный результат.		

Всего было сопоставлено 15 параметров, из фармакокинетических параметров были оценены *in vivo/in vitro* и *in silico* способность проникать через ГЭБ и кишечная абсорбция, оба вида исследований показали, что препарат способен проникать через ГЭБ и подвергается кишечной абсорбции. Биодоступность (20%) и период полувыведения (1,19-1,36 ч) были определены только в экспериментах *in vivo/in vitro*. Тест на кишечную абсорбцию на клеточной культуре Caco2 не проводился, по данным скрининга *in silico* тест отрицательный. В отчете компьютерного моделирования были получены данные о том, что риамилловир не является ингибитором и субстратом Р-гликопротеина, цитохрома СYP450, не ингибирует ROCT и hERG.

В экспериментальных исследованиях токсичности *in vitro* при помощи теста Эймса препарат риамилловир был идентифицирован как не мутагенный, отсутствие канцерогенного действия было установлено на гепатоцитах и альвеолярном эпителии легких мышей линии СВА. При этом данные об отсутствии канцерогенности в эксперименте *in vitro*, не согласуются с данными *in silico*, в которых риамилловир идентифицирован как канцерогенный препарат. При внутрижелудочном введении риамилловира лабораторным мышам и крысам была установлена доза LD₅₀ равная 8100-9500 мг/кг, *in silico* расчетная доза LD₅₀ равнялась 565,9 мг/кг, что практически в 16 раз меньше, чем в исследованиях *in vivo*.

Токсичность классифицировалась по-разному, по данным исследований *in vivo* была присвоена 5 степень токсичность по Hodge и Sterner и III категория токсичности по US EPA по данным скрининга *in silico*, что в обоих случаях оценивается как малая токсичность.

Заключение. Данные по оценке фармакокинетических и токсикологических исследований *in vitro/in vivo* и *in silico* для препарата риамилловир соотносятся между собой. В исследовании *in silico* были получены данные об отсутствии взаимодействия с цитохромом СYP450, Р-гликопротеином, ROCT и Herg, что существенно дополняет данные о фармакокинетике и фармакодинамике риамилловира.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Триазавирин – противовирусный препарат нового поколения. Под ред. О.Н.Чупахина. – Екатеринбург, 2016. – 254 С.
2. Benfenati E. Comparing *in vivo*, *in vitro* and *in silico* methods and integrated strategies for chemical assessment: problems and prospects // Alternatives to laboratory animals. – 2010. – V. 38, № 2. – P. 153-166.
3. Hannu R. *In Silico* Toxicology – Non-Testing Methods // Frontiers in Pharmacology. – 2011. – V.2, №33. – P. 1-8.
4. Обработка данных (admetSAR 2.0) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/predict/> (дата обращения: 02.10.2018).

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ТЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОЙ
ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСТРОФИИ РОГОВИЦЫ**

Е.О. Филиппова

Сибирский государственный медицинский университет,

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

E-mail: katerinabosix@mail.ru

REGULARITIES OF EXPERIMENTALLY INDUCED BULLOUS KERATOPATHY

E.O. Filippova

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovskii tr., 2, 634050

E-mail: katerinabosix@mail.ru

***Abstract.** The purpose of this study is to study the flow patterns of experimentally induced bullous keratopathy. Studies performed on 14 Wistar rats. The animals were injured and removed the endothelial layer of the cornea to reproduce the bullous keratopathy. Thus, it was established that mechanical damage to and removal of the corneal endothelium is accompanied by a secondary alteration of all its layers with a rapid - within 2 weeks - development of the bullous keratopathy.*

Введение. Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ЭЭД) роговицы является прогрессирующим, тяжелым заболеванием, в основе которого лежит развитие хронического отека ткани роговой оболочки, сопровождающееся значительным снижением остроты зрения и выраженными болевыми ощущениями. Исследования патогенеза ЭЭД роговой оболочки проводятся на экспериментальных моделях *in vivo*, которые формируются путем после полного удаления Десцеметовой мембраны роговой оболочки или введения в переднюю камеру глаза экспериментального животного 0,05% раствора хлорида бензалкония [1–3]. Однако выявление ЭЭД в разработанных моделях заболевания или не соответствует патогенетическим особенностям данного процесса, как, например, при моделировании с раствором хлорида бензалкония, или моделирование весьма нестабильно [1–3]. Вследствие этого многие аспекты патогенеза ЭЭД роговицы до настоящего времени остаются недостаточно изученными. Цель настоящего исследования являются изучение закономерностей течения экспериментально индуцированной ЭЭД роговицы.

Экспериментальная часть. Исследования выполнены на 14 половозрелых крысах - самцах породы Wistar (14 глаз) массой 250 г (протокол этического комитета № 3898 от 24.11.2014).

Для воспроизведения ЭЭД роговицы в условиях операционной под общей анестезией всем животным (14 крыс) с помощью иглы калибра 25 G, заостренный конец которой загнут под углом 90 градусов, повреждали и удаляли эндотелиальный слой роговой оболочки одного из глаз.

Через 2 недели после развития ЭЭД роговицы животным проводили наружный осмотр, оптическую когерентную томографию роговицы (ОКТ), и выводили из эксперимента с последующей энуклеацией, фиксацией полученного материала и окраской гематоксилин-эозином и пикрофуксином по методу Ван Гизона для световой микроскопии. Подсчет удельных объемов эпителия, стромы роговицы

осуществлялся при помощи окулярной сетки Автандилова на 50 точек (=100 %). Контролем служили интактные вторые глаза животных.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием статистического пакета IBM SPSS Statistics 20. Статистически значимыми различия считали при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Согласно данным наружного осмотра через 2 недели от начала эксперимента у всех животных были признаки экспериментально индуцированной дистрофии роговой оболочки в виде диффузного отека и помутнения роговицы в сочетании со светобоязнью, слезотечением и расширением сосудов конъюнктивы больного глаза.

Данные наружного осмотра подтверждались результатами ОКТ роговицы больного глаза: у всех экспериментальных животных отмечалось увеличение толщины роговой оболочки в 2,4 раза по сравнению с нормой (160 мкм), составляя в среднем 382 ± 53 мкм, и формирование булл между эпителием и Боуеновой мембраной (рис. 1).

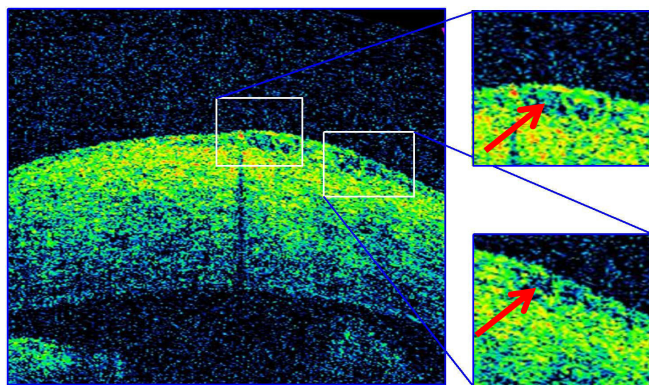


Рис. 1. Фрагмент ОКТ роговицы с буллами (указаны стрелками) экспериментального животного через 2 недели после развития индуцированной ЭЭД роговицы

Гистологические исследования, проведенные через 2 недели после моделирования ЭЭД роговицы, позволили верифицировать заболевание. У всех животных при световой микроскопии в переднем эпителии роговой оболочки выявлялись признаки баллонной дистрофии: вакуолизация цитоплазмы, гиперхромия ядер. Количество дистрофически измененных эпителиоцитов составляло $21,1 \pm 1,0$ клеток в поле зрения. Толщина переднего эпителия роговицы находилась в пределах $39,3 \pm 0,5$ мкм при нормальном значении данного показателя у крысы $28 \pm 2,8$ мкм ($p < 0,05$). Собственное вещество роговой оболочки было представлено резко гидратированными и местами расслоенными отечной жидкостью коллагеновыми волокнами. Удельный объем отека составлял $32,2 \pm 2,8\%$ ($p < 0,05$). Задняя пограничная мембрана была неравномерно утолщена, эндотелий роговицы отсутствовал на всем протяжении (рис. 2).

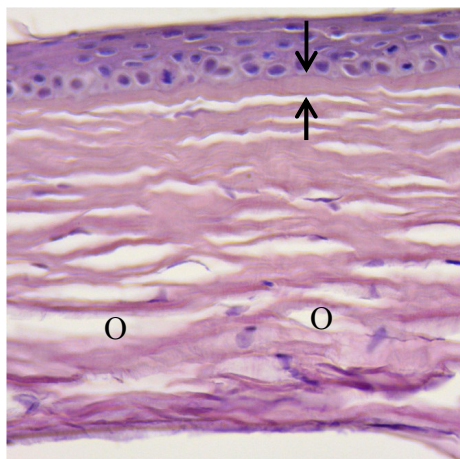


Рис. 2. Отек (O) собственного вещества, утолщение Боуменовой мембраны (указано стрелками) роговицы экспериментального животного через 2 недели после развития индуцированной ЭЭД роговой оболочки. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200

Таким образом, воспроизведение в эксперименте *in vivo* ЭЭД роговицы путем повреждения и удаления эндотелиального слоя роговой оболочки крыс сопровождается вторичной альтерацией остальных слоев ткани с быстрым – в течение 2 недель – развитием заболевания. При этом сроки развития инструментальных и морфологических признаков экспериментально индуцированной ЭЭД роговицы сопоставимы с таковыми при спонтанном течении заболевания в клинической практике. Это свидетельствует об адекватности разработанной модели ЭЭД роговой оболочки у крыс-самцов породы Wistar. Можно предположить, что в условиях отсутствия эндотелия роговицы внутриглазная жидкость, повышено диффундируя в строму, способствует дезорганизации ткани основного вещества роговой оболочки с последующей деструкцией коллагеновых волокон. Прогрессирование отека на субклеточном уровне, вероятно, сопровождается сморщиванием митохондрий и рибосом, разрушением лизосом и высвобождением ферментов. Как следствие, развивается ацидоз с увеличением дисперсности коллоидов и повышением их способности притягивать и удерживать воду. В строме роговицы нарастает уровень содержания Na^+ и K^+ , прогрессирует гиперосмия, что способствует усилению отека и вторичным дистрофическим изменениям всех слоев роговой оболочки.

Заключение. Таким образом, в эксперименте *in vivo* установлено, что механическое повреждение и удаление эндотелия роговицы сопровождается вторичной альтерацией всех ее слоев с быстрым – в течение 2 недель – развитием ЭЭД роговой оболочки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mengmeng W. Effect of Glyceraldehyde Cross-Linking on a Rabbit Bullous Keratopathy Model Hindawi Publishing Corporation // Journal of Ophthalmology. – 2015. – № 5. – P. 1–5.
2. Bredow L., Schwartzkopff J., Reinhard T. Regeneration of corneal endothelial cells following keratoplasty in rats with bullous keratopathy // Molecular vision. – 2014. – № 20. – P. 683–690.
3. Melles G. R. J., Wijdh R. H. J., Nieuwendaal C. P., A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis) // Cornea. – 2004. – № 23. – P. 286–288.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ К
АНТИБИОТИКУ ПИОЦИАНИНУ**Е.А. Хан

Научный руководитель: доцент, к.м.н. М.В. Чубик

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

Россия, 634050, г. Томск, проспект Ленина, дом 30, 634050

E-mail: elenal@tpu.ru**DETERMINATION ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF SPORE-FORMING BACTERIA TO
PYOCYANIN**E. A. Khan

Scientific Supervisor: Associate Professor, Candidate of Medical Sciences M. V. Chubik

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

E-mail: elenal@tpu.ru

Abstract. Isolation of new antibiotics from substances that weren't previously used as antimicrobial drugs may be effective against resistant bacteria. *Pseudomonas aeruginosa* is a producer one of these substances. Pyocyanin is the blue-green pigment of the phenazine series and the secondary metabolite. In the present study, a five-day cultivation of *P. aeruginosa*, extraction and analysis of pyocyanine was carried out. Confirmation of the pyocyanin was done through UV-visible spectrophotometric analysis. In UV-Vis spectrophotometric analysis, a maximum absorption was observed at 690nm. Pyocyanin was used to determine the minimum inhibitory concentration against spore-forming bacteria *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. The serial dilution method showed that for *Bacillus cereus* the minimum inhibitory concentration of pyocyanin is 29 µg/ml, and for *Bacillus subtilis* 17,8 µg/ml. It was detected, that pyocyanin can suppress the growth of spore-forming bacteria.

Введение. В настоящее время резистентность микроорганизмов к существующим антимикробным агентам увеличивается, поэтому возникает необходимость в получении новых антибиотиков. Пиоцианин может использоваться в качестве терапевтического средства для лечения инфекционных заболеваний, вызванных различными бактериями. Целью исследования ставится определение минимальной подавляющей концентрации пиоцианина для спорообразующих бактерий на примере бактерий рода *Bacillus*.

Bacillus subtilis — это грамположительные спорообразующие аэробные бактерии, имеет вид прямой палочки без цвета, размер примерно составляет 0,7 мкм в толщину и 2—8 мкм в длину. *B. subtilis* обнаруживается в почве и желудочно-кишечном тракте жвачных животных и человека. Сенная палочка способна вызвать острый гастроэнтерит. *B. cereus* является одним из наиболее распространенных загрязняющих веществ на фармацевтических производствах [1, 2].

Pseudomonas aeruginosa является грамотрицательной палочковидной бактерией, которая может секретировать небольшие органические молекулы, экзоферменты, ферменты, разрушающие ткани, токсины и другие субстраты, которые нарушают физиологические функции человека. Пиоцианин – синезеленый пигмент, один из представителей антибиотиков феназинового ряда, которые выделяют бактерии

Ps. aeruginosa. Вторичный метаболит губительно влияет на эукариотические и прокариотические клетки, а также обладает высокой бактерицидной активностью. Ингибирование жизнедеятельности микроорганизмов пиоцианином является результатом его уникального окислительно-восстановительного действия. Во время дыхания пиоцианин способен преобразовывать кислород в супероксидный радикал, поэтому устойчивость бактерии к пиоцианину будет определяться уровнем супероксиддисмутазы и каталазы, которыми обладает организм, а также наличием кислорода. *Ps. aeruginosa* способна сопротивляться пиоцианину из-за ограниченного окислительно-восстановительного цикла этого соединения и в условиях, благоприятствующих выработке пиоцианина, активность каталазы и супероксиддисмутазы возрастает [3].

Экспериментальная часть. На первом этапе эксперимента была получена суточная культура продуцента антибиотика *Ps. aeruginosa* на ГРМ-агаре №9. Для выделения пиоцианина культивирование проводили в течение 5 дней в ГРМ-бульоне в термостате при 37°C.

На следующем этапе пигмент экстрагировали из культуральной жидкости с помощью хлороформа в соотношении 2:1. Полученный раствор очистили и проанализировали с помощью тонкослойной хроматографии, высокоэффективной хроматографии и спектрофотометра. Концентрация пиоцианина была определена по формуле Бугера-Ламберта-Бера (1) при длине волны 690 нм:

$$C = M \times \frac{D}{\varepsilon \times l} \quad (1)$$

где С – концентрация вещества в растворе, мг/мл;

D – оптическая плотность поглощающего вещества;

M – молярная масса, (210 г/моль);

ε – молярный коэффициент поглощения (для пиоцианина $\varepsilon=3400 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$);

l – длина оптического пути.

Для достижения поставленной цели определяли чувствительность *Bacillus subtilis* и *B. cereus* к пиоцианину с определением показателя минимальной подавляющей концентрации антибиотика (МПК). Чувствительность бактерий к пиоцианину определялась методом серийных разведений в мясо-пептонном бульоне. Концентрация раствора антибиотика рассчитывалась исходя из максимальной концентрации в серии разведений, а также с учетом разбавления пиоцианина при последующей инокуляции. По данным литературы, минимальной подавляющей концентрацией антибиотика для *Bacillus subtilis* является 17,8 мкг/мл, для *Bacillus cereus* 14,5 мкг/мл [4]. Для приготовления инокулюма получали суточную микробную взвесь в физиологическом растворе, эквивалентную 0,5 по стандарту мутности МакФарланда. Концентрация микроорганизмов составила примерно 10^6 КОЕ/мл.

Далее добавили в каждую пробирку по 1 мл инокулюма, а также в пробирку с бульоном без пиоцианина для контроля культуры. Инкубация проводилась при комнатной температуре в течение 24 часов. Пробирка с «отрицательным» контролем хранилась в холодильнике при +3 °C.

Эксперименты по определению минимальной подавляющей концентрации пиоцианина по отношению к бациллам повторяли шесть раз. Вычисляли среднее значение. Для сравнения полученных результатов использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты. Рост микроорганизмов в пробирках контролировали визуально. После этого был произведен пересев культур из пробирок на чашки Петри с ГРМ-агаром №4, для определения количества колоний. Культивировали чашки Петри с посевами в течение 24 часов при температуре 37°C, после этого учитывали результаты. Полученные результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Минимальная подавляющая концентрация (МПК) пиоцианина, мкг/мл

МПК, мкг/мл	Опытные микроорганизмы	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
	17,8 ± 1,6	29 ± 1,5

Значение t-критерия Стьюдента 5,11. Различия являются статистически значимыми (p = 0,0006), число степеней свободы f = 10. Критическое значение t-критерия Стьюдента = 2,2, при уровне значимости α = 0,05.

В ходе эксперимента была определена МПК антибиотика пиоцианина для *Bacillus subtilis*. При конечной концентрации антибиотика 71,2 мкг/мл, 35,6 мкг/мл и 17,8 мкг/мл рост бактерий на чашке Петри не наблюдался, а пробирки с бульоном, пиоцианином и инокулюмом оставались прозрачными. При конечной концентрации антибиотика 8,9 мкг/мл отмечали слабый рост культуры и более интенсивный рост при концентрации пиоцианина 4,45 мкг/мл. Следовательно, минимальной подавляющей концентрацией является 17,8 мкг/мл.

При конечной концентрации пиоцианина 116 мкг/мл, 58 мкг/мл и 29 мкг/мл рост *Bacillus cereus* отсутствовал. При концентрации антибиотика 14,5 мкг/мл на плотной среде образовались характерные колонии. При сравнении показателя МПК пиоцианина по отношению к разным представителям рода бацилл, установили, что для губительного эффекта по отношению к *Bacillus subtilis* достаточно 17,8 ± 1,6 мкг/мл пиоцианина. Для подобного эффекта по отношению к *Bacillus cereus* необходимо 29 ± 1,5 мкг/мл пиоцианина.

Заключение. Данное исследование показывает возможность использования пиоцианина, выделенного от *Pseudomonas aeruginosa*, как антибиотика, который может подавлять рост спорообразующих бактерий. Для ингибирования роста бактерий на модели рода *Bacillus* установлено, что необходима небольшая концентрация антибиотика.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borriss R., Danchin A., Harwood C. *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement // *Microbial Biotechnology*. – 2018. – Vol. 1, №4. – P. 3–17.
2. Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алёшкин А.В. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики. Научное издание. – Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – 98 с.
3. Hassan H.M., Fridovich I. Mechanism of the antibiotic action pyocyanine // *J Bacteriol*. – 1980. – Vol. 141, №1. – P. 156–163.
4. Baron S.S., Terranova G., Rowe J.J. Molecular mechanism of the antimicrobial action of pyocyanin // *Current microbiology*. – 1989. – Vol. 18, Issue 4. – P. 223–230.

**ВЛИЯНИЕ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИ(L-ЛАКТИД-СО-ГЛИКОЛИДА) И ФОСФАТОВ
КАЛЬЦИЯ НА ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ ПРИ
ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ**

Е. Шаповалова, В.В. Ботвин, А.С. Гигилев

Научный руководитель: д.м.н. Е.Ю. Шерстобоев, руководитель фармпроектов ИХТЦ Л.А. Покровская
Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050
E-mail: elenas6691@gmail.com

**THE EFFECT OF SCAFFOLDS BASED ON POLY(L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) AND CALCIUM
PHOSPHATES ON THE PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF MACROPHAGES
DURING LONG CULTIVATION**

E. Shapovalova, V.V. Botvin, A.S. Gigilev

Scientific Supervisor: Dr. E.Yu. Sherstoboev, Head of Pharmaceutical Projects ECTC L.A. Pokrovskaya
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050
E-mail: elenas6691@gmail.com

***Abstract.** The study of the effect of scaffolds based on poly(lactide-co-glycolide) and calcium phosphates on the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines by primary human macrophages during long-term cultivation showed that secretion of TNF- α , IL-6, IL-1 β during the cultivation of cells on the surface of scaffolds does not exceed the level of cytokine's content in the control. It can be assumed that such materials do not cause a chronic inflammatory response.*

Введение. Среди всех биоматериалов особый интерес вызывают полимеры лактида и гликолида, как материалы для хирургических нитей, оболочек лекарств пролонгированного действия, а также в качестве полимерной матрицы для изготовления скаффолдов, применяемых при регенерации различных тканей человека [1]. Такие материалы представляют интерес для медицинского применения, поскольку являются биосовместимыми с организмом человека, разлагаются до безвредных метаболитов.

Основной клинической проблемой при применении имплантируемых материалов является воспаление, как острое, так и хроническое. Ключевыми клетками, которые способны как простимулировать, так и подавить воспалительные реакции в условиях микроокружения имплантата являются тканевые макрофаги. Активация тканевых макрофагов и осуществляемые ими в дальнейшем иммунологические функции определяются локальным иммунным статусом микроокружения клеток и происходят в двух основных направлениях: M1-активация вызывает каскад иммунологических реакций, приводящих к развитию воспаления и повреждению тканей и сопровождающихся усиленной секрецией провоспалительных цитокинов. M2-активация, напротив, обусловлена макрофагами второго типа, биологическая роль которых состоит в регуляции интенсивности иммунного ответа, в том числе путем секреции противовоспалительных цитокинов и приводит к усилению ангиогенеза с последующей репарацией тканей [2].

По реакции макрофагов на имплантационные материалы можно сделать выводы об отторжении или принятии этого имплантата организмом пациента и предсказать ответ иммунной системы [3]. Целью работы является исследование влияния скаффолдов на основе поли(лактид-со-гликолид)а и фосфатов кальция на секрецию провоспалительных цитокинов первичными макрофагами человека при длительном культивировании.

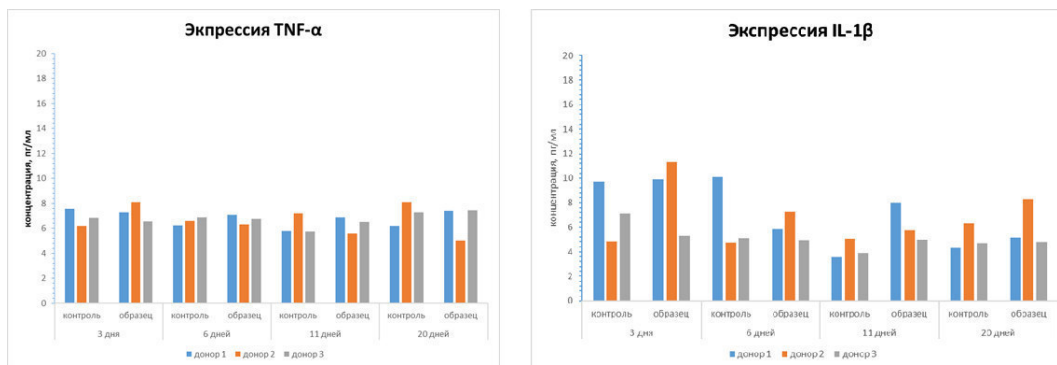
Экспериментальная часть. Полимерные скаффолды представляют собой композит на основе поли(лактид-со-гликолид)а (ПЛГА) и смеси гидроксиапатита $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ и β -трикальций фосфата $Ca_3(PO_4)_2$. Исследование влияния полимерных скаффолдов на клеточно-опосредованный иммунный ответ проводили по схеме, представленной на рисунке 1.



Рис.1. Схема исследования влияния полимерных скаффолдов на активность макрофагов

Для исследовательских целей в качестве источника моноцитов использовали лейкотромбослой индивидуальных добровольных доноров [4]. Выделенные клетки ресуспендировали в клеточной среде X-VIVO с добавлением дексаметазона и M-CSF. В качестве контроля исследовали клетки, культивированные на пластике без образцов модельных скаффолдов. Клетки инкубировали при температуре 37°C и 7,5% CO₂ в течение 20 дней. Отбор проб осуществляли на 3, 6, 11 и 20 сутки после начала культивирования клеток для анализа экспрессии цитокинов, участвующих в реализации иммунного ответа и воспалительной реакции при длительном культивировании клеток. В качестве основных параметров, характеризующих поляризацию макрофагов в направлении провоспалительного иммунного ответа (M1 фенотип), были выбраны ключевые цитокины M1 макрофагов: TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-8. Основным методом определения влияния скаффолдов на продукцию цитокинов был выбран иммуоферментный анализ.

Результаты. Исследование влияния скаффолдов на экспрессию TNF- α показало, что в течение всего периода культивирования концентрация анализируемого цитокина не превышает уровня контроля (Рис.2). Можно сделать вывод, что культивирование моноцитарных макрофагов человека на поверхности скаффолдах в течение 20 дней не вызывает развития воспалительной реакции.



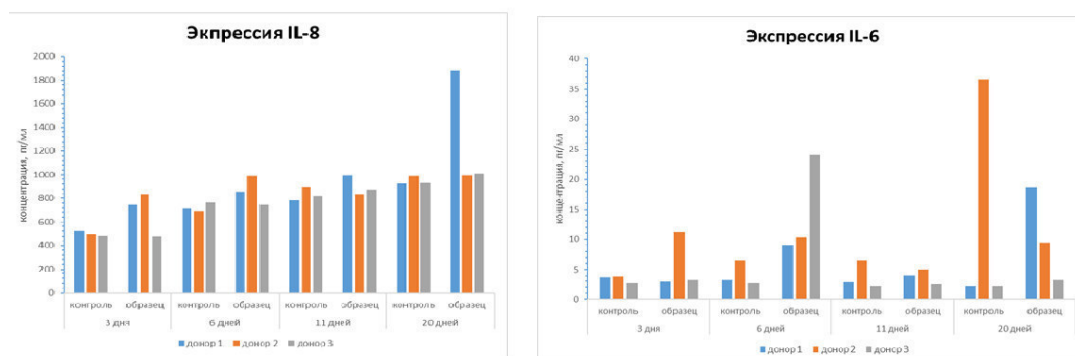


Рис.2. Влияние скаффолдов на производство TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-8 первичными моноцитарными макрофагами человека

Секреция IL-6 указывает на донорспецифичный ответ моноцитарных макрофагов на образцы скаффолдов: у доноров 2 и 3 скаффолд не стимулирует повышенной секреции IL-6, т.е. не вызывает провоспалительного эффекта. Анализ экспрессии IL-1 β показал, что в первые трое суток после начала инкубации концентрация цитокина при культивировании клеток доноров 1 и 2 на поверхности образцов выше, чем при посеве клеток на пластике, но при длительном культивировании в течение 20 дней концентрация исследуемого цитокина снижается, что свидетельствует о снижении провоспалительного эффекта скаффолдов. При длительном культивировании наблюдается высокая концентрация IL-8, что можно объяснить не только его провоспалительным эффектом, но и его свойствами вызывать миграцию клеток и способствовать их адгезии в местах имплантации материала.

Заключение. В результате проведенного исследования было установлено, что секреция TNF- α , IL-6, IL-1 β при культивировании первичных макрофагов на поверхности исследуемого полимерного материала не превышает уровня содержания в контроле, и можно сделать предположение, что такие материалы не вызывают хронического воспалительного ответа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 14.575.21.0164, идентификатор RFMEFI57517X0164.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mir M. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery // Colloids Surf. B: Biointerfaces. – 2017. – V. 159. – P. 217–231.
2. Murray P.J. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines // Immunity. – 2014. – V. 41. – P. 14–20.
3. Stankevich K.S. Surface modification of biomaterials based on high-molecular polylactic acid and their effect on inflammatory reactions of primary human monocyte-derived macrophages: Perspective for personalized therapy // Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. – 2015. – V. 51. – P. 117-26.
4. Gratchev A. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages // Scand J Immunol. – 2005. – V. 61. – P. 10–17.

**ВЫХОД НА «SINGLE CELL»: ПОЛУЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК ИЗ
АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК С ЦЕЛЬЮ ИХ МОЛЕКУЛЯРНОГО
ПРОФИЛИРОВАНИЯ**

Д.В. Шарыш, А.В. Марков, Е.С. Григорьева

Научный руководитель: д-р мед. наук М.С. Назаренко, д-р мед. наук О.Е. Савельева

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

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

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

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

E-mail: sharysh.diana@gmail.com

**TOWARDS TO SINGLE CELL: SEGREGATION OF DIFFERENT CELL TYPES FROM
ATHEROSCLEROTIC PLATES WITH THE PURPOSE OF THEIR MOLECULAR PROFILING**

D.V. Sharysh, A.V. Markov, E.S. Grigoryeva

Scientific Supervisor: Dr. M.S. Nazarenko, Dr. O.E. Savelyeva

Research Institute of Medical Genetics of Tomsk National Research Medical Center

Russia, 634050, Tomsk, Ushayka embankment 10

Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center

E-mail: sharysh.diana@gmail.com

Abstract. *This study of atherosclerotic plaque at the level of single cells is the next step in understanding the role of various cell types in atherogenesis. We investigated the effectiveness of frequently used technologies for isolating single cells from whole tissue. Laser microdissection (LCM) and fluorescence activated cell sorting (FACS) methods have been used to obtain CD68+ and α -SMA+ cells on samples of arteries affected by atherosclerosis. In conclusion, the FACS method gives a greater cell yield and the ability to determine a more detailed immunophenotype of cells, and the LCM method does not allow obtaining a large amount of material and is not so accurate in characterizing the cell phenotype, but it is implemented relatively simply and quickly.*

Введение. Атеросклероз представляет собой хронический воспалительный процесс сосудов среднего и крупного диаметра, который характеризуется образованием бляшек (АБ), состоящих из пенных, иммунных, эндотелиальных и гладкомышечных клеток (ГМК), тромбоцитов, внеклеточного матрикса и богатого липидами ядра с обширным некрозом и фиброзом окружающих тканей [1]. Механизмы этих процессов недостаточно изучены, поскольку отдельные изменения в единичной клетке невозможно оценить, изучая цельную ткань. Выход на уровень отдельных клеток позволит уточнить молекулярные механизмы, лежащие в основе атерогенеза, в различных типах клеток. На сегодняшний день одними из наиболее используемых техник разделения ткани на клетки являются лазерная микродиссекция (Laser Capture Microdissection – LCM) и флуоресцентно-активированный сортинг клеток

(Fluorescence Activated Cell Sorting – FACS) [2]. Эффективность технологий получения клеток характеризуется тремя параметрами: *выходом* (сколько клеток может быть выделено за определенное время), *чистотой* (доля клеток-мишеней, собранных после разделения) и *извлечением* (доля клеток-мишеней, полученных после изоляции, по сравнению с первоначально доступными клетками-мишенями в образце) [3]. До непосредственной изоляции клеток необходимо провести подготовку образцов, которая также у обоих методов отличается по трудоемкости и скорости выполнения.

Цель исследования: оценить эффективность использования методов LCM и FACS для получения клеток разного типа из атеросклеротических бляшек артерий.

Экспериментальная часть. Образцы атеросклеротических бляшек 24 человек (74,6±16,3 лет, 15 мужчин и 9 женщин) были получены в результате операции на артериях, либо аутопсии. Материал был разделен на 2 группы – для изучения с помощью методов LCM и FACS.

Метод LCM. Микропрепараты были приготовлены посредством криосекции 12 образцов атеросклеротических бляшек с получением двух стекол серийных срезов каждого образца (всего 24 микропрепарата). Окраска осуществлялась по стандартному протоколу с антителами к альфа-актину ГМК (αSMA) или с антителами к рецептору CD68 макрофагов, после чего ядра подкрашивались гематоксилином. Срезы были помещены на стекла с PET-мембраной. Вырезание областей интереса (отдельных клеток с ядром или групп клеток) проводили на приборе PALM MicroBeam (Carl Zeiss).

Метод FACS. Для отработки протокола получения клеточной суспензии были опробованы несколько ранее описанных ферментативных смесей [4-6]. Оптимальная дезагрегация клеток достигалась путем инкубирования образца со смесью ферментов, содержащей 500 Ед/мл коллагеназы Ia, 60 Ед/мл гиалуронидазы, 2,5 мл 20 mM HEPES в DPBS. После препарирования от перивазальной ткани и кальцинов, образец измельчался ножницами в 0,5 мл ферментной смеси, после чего добавляли еще 2 мл ферментного микса. Инкубация проходила при 37°C и постоянном помешивании в течение 2 часов, после чего суспензию клеток фильтровали через клеточный фильтр (70 мкм). Пробирки центрифугировали дважды по 10 мин. при 300 g. Осадок был ресуспендирован в 1 мл среды DMEM. Оценка выживаемости клеток проводилась после окраски 0,4% трипановым синим. При иммуноокрашивании клеток неспецифическое связывание блокировалось инкубацией образцов с 5% FBS. В эксперименте были использованы изотипические контроли и неокрашенный образец. Иммуноокрашивание проводили на наличие поверхностных (CD45, CD14, CD31, CD163) и внутриклеточных антигенов (CD68, αSMA). Проточная цитофлюориметрия и сортировка клеток были проведены на приборе BD MoFlo XDP (Beckman Coulter). В отдельные пробирки были отобраны клетки со следующими иммунофенотипами: ГМК (αSMA+CD68-), M1-макрофаги (CD45+CD14+CD68+), M2-макрофаги (CD45+CD14+CD163+) и эндотелиальные клетки (CD45-CD31+).

Результаты. С помощью LCM были получены 24 микропробирки, в каждой из которых содержалось приблизительно 1000 клеток. Этап подготовки срезов занял примерно 2 недели, этап микродиссекции столько же. Кроме скорости выполнения, удобством использования данного метода является возможность микроскопии исследуемого образца, а также пригодность оставшихся микропрепаратов для других анализов. Однако небольшой *выход* ограничивает спектр дальнейших процедур молекулярно-генетического анализа. *Чистота* полученных клеток могла ухудшаться из-за контаминации соседними клетками, а *извлечение* клеток низкое, поскольку из-за вариативности толщины

препарата не всегда удается вырезать таргетные клетки. Кроме того, в иммуногистохимии ограничено количество маркеров, которые можно выявить одновременно на одном срезе. Успешность LCM определяет навык цитолога/гистолога определить таргетные клетки, что может являться ограничением в применении данной технологии. Методом FACS было получено по 4 субпопуляции клеток от 5 пациентов. Материал от других 7 пациентов был использован для оптимизации методики энзиматической дезагрегации. Средняя общая клеточность суспензии, получаемой из свежего образца, составляла 1 млн клеток/мл, средняя выживаемость клеток – 69%. Этап отработки процедуры дезагрегации бляшек занял 4 месяца, проточной цитофлуориметрии и сортировки – 2 недели. Главными достоинствами данного метода является высокий *выход* и *чистота* таргетных клеток, а также возможность многоцветного окрашивания, что дает возможность определения более подробного фенотипа клеток. Самой проблемной процедурой является дезагрегация артерии до синглетного состояния клеток, поскольку подбор оптимального состава ферментативного микса происходит эмпирически. Кроме того, некротический дебрис бляшки обладает аутофлуоресценцией. Решением данной проблемы стало тщательное препарирование и очистка образцов атеросклеротической бляшки от атероматозных масс. Преимуществом обоих описываемых способов сортировки клеток является то, что они не требуют предварительного культивирования.

Заключение. Методы FACS и LCM отличаются, главным образом, *выходом* таргетных клеток и используемой панелью маркеров. Для дальнейшего молекулярно-генетического анализа, требующего большого количества входного материала или отбора клеток по нескольким маркерам, следует использовать метод FACS. Если в этом нет необходимости (например, при исследовании клеток, меченых единственным маркером), удобнее использовать LCM.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-10146).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bui Q.T., Prempeh M., Wilensky R.L. Atherosclerotic plaque development // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 2009. – V. 41. – № 11. – P. 2109-2113.
2. Gross A., Schoendube J., Zimmermann S., Steeb M. et al. Single Cell Isolation Trends: Technologies, Limitations & Applications // Int. J. Mol. Sci. – 2015. – № 16(8). – P. 16897-16919.
3. Hu P., Zhang W., Xin H., Deng G. Single Cell Isolation and Analysis // Front. Cell Dev. Biol. – 2016. – №4. – P. 116.
4. Bonanno E., Mauriello A., Partenzi A., Anemona L. et al. Flow cytometry analysis of atherosclerotic plaque cells from human carotids: a validation study // Cytometry. – 2000. – №39. – P. 158-165.
5. Hu D., Yin C., Mohanta S.K. et al. Preparation of Single Cell Suspensions from Mouse Aorta // Bio Protoc. – 2016. – V. 6. – № 11. – e1832.
6. Galkina E., Kadl A., Sanders J. et al. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent // J. Exp. Med. – 2006. – V. 203. – № 5. – P. 1273-1282.

**ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ОПУХОЛЕВАЯ ПРОГРЕССИЯ КАРЦИНОМЫ
ЛЬЮИСА НА ФОНЕ ВИРОТЕРАПИИ ВИРУСОМ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА *IN VIVO***

Е.В. Шекунов, К.С. Юрченко

Научный руководитель: профессор, д.б.н. А.М. Шестопапов,
Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины,
Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, 630117
E-mail: e.shekunov@alumni.nsu.ru

**IMMUNOLOGICAL PARAMETERS AND TUMOR PROGRESSION OF CARCINOMA LEWIS IN
VIROTHERAPY RESPONSE WITH NEWCASTLE DISEASE VIRUS *IN VIVO***

E.V. Shekunov, K.S. Yurchenko

Scientific Supervisor: Prof, Dr. A.M. Shestopalov,
Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine,
Russia, Novosibirsk, Timakova st. 2, 630117,
E-mail: e.shekunov@alumni.nsu.ru

Abstract. *In this research, we studied the growth dynamics of the tumor site and the nature of the morphological changes in the tumor tissue of the grafted subcutaneous Lewis carcinoma in C57Bl / 6 mice after a course of intravenous and intratumoral virotherapy with a natural strain of Newcastle Disease NDV / Altai / pigeon / 770/2011. In animals treated with virus injections, the development of necrotic processes was observed in the tumor site of carcinoma with a significant regression of the tumor compared with control untreated animals, as well as morphometric data indicate a decrease in the frequency of mitoses of abnormal cells. An increase in the level of pro-inflammatory cytokines has been noted.*

Введение. Согласно последним опубликованным данным МНИОИ им. П.А. Герцена, в 2017 г. в России выявлено 617,2 тыс. случаев злокачественных новообразований [1]. Вследствие роста негативных экзогенных факторов частота появления опухолей повышается и по прогнозам ВОЗ к 2020 году будет составлять 22 миллиона случаев ежегодно. К сожалению, на данный момент не существует универсальной и таргетной терапии для лечения онкологических заболеваний. Консервативные подходы обладают рядом противопоказаний и широким спектром побочных эффектов, что как следствие, стимулирует развитие поиска новых методов лечения. Одним из альтернативных подходов является применение онколитических вирусов, которые способны находить и селективно убивать клетки опухоли. Среди онколитических вирусов представители разных таксономических семейств: вирус простого герпеса, вирус Сендай, вирус кори, аденовирусы, а также птичий парамиксовирус – вирус болезни Ньюкасла (ВБН). ВБН обладает рядом преимуществ: отсутствием обмена генов посредством рекомбинации, отсутствием взаимодействия с ДНК клетки хозяина и слабыми побочными эффектами у онкобольных при виротерапии [2], что обуславливает его применение как более выгодное и рациональное. Исследуемый штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011 уже показал возможность своего успешного применения при воздействии на клеточные культуры с помощью прямого онколитического эффекта [3], однако механизмы иммуноопосредованной клеточной гибели остаются малоизученными.

В связи с этим, мы изучили влияние онколитического природного вируса болезни Ньюкасла, выделенного от дикого голубя [4] на динамику роста карциномы легкого Льюиса и на динамику цитокинового профиля *in vivo*.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на 74 самцах мышей линии C57Bl/6 (возраст 4-5 недель). В качестве опухолевой линии использовали клетки карциномы легких Льюиса, которые вводились мышам подкожно по средней линии живота из расчета 200 тысяч клеток на мышь. Начиная со дня пальпации опухоли, проводили интратуморальную и системную виротерапию. Штамм вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011, выделенный от дикого голубя, нарабатывали в аллантоисной жидкости развивающихся куриных эмбрионов. Вирус в объеме 100 мкл вводили внутривенно (в ретроорбитальный синус) и интратуморально (непосредственно в опухоль) по 4 инъекции через день.

Для оценки иммунологических и морфометрических показателей мыши были разделены на пять групп: 1) Интактные, 2) LLC без виротерапии, 3) Внутривенное введение вирусных частиц мышам без опухоли, 4) Внутривенная виротерапия LLC, 5) Интратуморальная виротерапия LLC. Морфометрический анализ был основан на гистологических препаратах первичной опухоли, окрашенных гематоксилином и эозином. Определение уровня цитокинов сыворотки крови проводили иммуноферментным анализом в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Использовали ИФА наборы IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN γ (BioSource, Intrenational, Inc. USA).

Для оценки выживаемости и динамики опухолевого роста использовалась вторая экспериментальная группа мышей с разделением на три подгруппы: 1) LLC без онколитической терапии, 2) Внутривенная виротерапия LLC, 3) Интратуморальная виротерапия LLC. Оценка выживаемости проводили на основании продолжительности жизни мышей после формирования опухолевого узла и начала онколитической терапии. Процент увеличения продолжительности жизни вычисляли по формуле: (Средняя продолжительность жизни в контрольной группе – Средняя продолжительность жизни в опытной группе / Средняя продолжительность жизни в контрольной группе) X 100. Для динамики роста начиная с двадцатых суток после введения опухолевых клеток определяли продольный и поперечный размер опухолевого очага. Объем опухоли рассчитывали по формуле $V=ab^2/2$.

Оценка статистической значимости полученных результатов была проведена с помощью t-критерия Стьюдента. Различие считалось достоверным при $p < 0,05$.

Результаты. В ходе нашего исследования было показано, что мыши в группе с внутривенным введением ВБН показали увеличение сроков жизни на 8,13% от начала введения опухоли и на 12,23% от начала инъекций вируса. При введении вирусных частиц интратуморально показатель выживаемости не изменило.

Динамика роста опухолевого очага свидетельствуют, что в группе с внутривенной виротерапией, размер опухолей уменьшается на 40-50% на всех сроках наблюдения. В группе с интратуморальным введением ВБН, вначале отмечено увеличение размера новообразований на 35%, однако, позже на 16-е и 19-е сутки после начала виротерапии отмечено уменьшение опухолевого роста на 17%.

Морфометрические данные демонстрируют усиленное развитие некротических изменений при виротерапии на 10-е и 13-е сутки как при интратуморальном, так и при системном введении вируса, однако к 16-м суткам этот показатель становится соизмерим с контрольной величиной. В свою очередь

количество митозов аномальных клеток, регистрируемых в полях зрения, при виротерапии снижается во всех временных точках.

Анализ цитокинового профиля мышей указывает на увеличение концентрации интерлейкина-2 (ИЛ-2) на 10-е сутки после начала введения ВБН (в 7,5 раз при внутривенном введении, в 4,5 раз при интратуморальном введении). При введении ВБН здоровым животным наблюдалось повышение концентрации ИЛ-2 в 5,7 раз. В то же время введение исключительно опухолевых клеток снижает концентрацию ИЛ-2. Уровень ИЛ-4, при введении ВБН животным без опухоли, немного повышался на всех сроках наблюдения, достигая максимума на 10-е сутки – в 2,3 раза. При введении ВБН мышам с LLC, повышения уровня ИЛ-4 не было. У животных-опухоленосителей при введении NDV концентрация ИЛ-10 достоверно снижалась на всех сроках наблюдения независимо от способа введения. При отсутствии клеток LLC в организме мыши трансдукция NDV демонстрирует аналогичные показатели. Различия по уровню ИЛ-17 на 10-е сутки указывают на его повышение в 1,9 раз при внутривенном введении, в остальных группах показатели 10-х суток приближены к контрольным. На 10-е сутки, после начала виротерапии при введении опухоли LLC без NDV, продукция ИФН γ возрастала в 2,1 раз. Введении NDV животным без опухоли, при аналогичных временных показателях, повышает продукцию ИФН γ в 3,1 раз, в свою очередь, внутривенная виротерапия увеличивает количество ИФН γ в 4,6 раза, а интратуморальная в 2,6 раза.

Заключение. Таким образом, анализ выживаемости мышей-опухоленосителей свидетельствует об увеличении продолжительности жизни животных при онколитической виротерапии ВБН. В то же время имеется значительное замедление роста первичной опухоли на всех сроках наблюдения при внутривенном введении вирусных частиц. Данные уровня цитокинового профиля указывают на изменение иммунного баланса в сторону Th1 иммунного ответа и снижение иммуносупрессорных влияний опухоли.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) //М.: МНИОИ им. ПА Герцена. – 2018. – Т. 250.
2. Zhao L., Liu H. Newcastle disease virus: a promising agent for tumour immunotherapy //Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. – 2012. – vol. 39, №. 8. – P. 725-730.
3. Yurchenko K.S. et al. Oncolytic effect of wild-type Newcastle disease virus isolates in cancer cell lines in vitro and in vivo on xenograft model //PloS one. – 2018. – vol. 13, №. 4. – P. e0195425.
4. Yurchenko K.S. et al. Complete genome sequence of a Newcastle disease virus isolated from a rock dove (*Columba livia*) in the Russian Federation //Genome Announc. – 2015. – vol. 3, №. 1. – P. e01514-14.

**ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ,
СВЯЗАННЫХ С ФОРМИРОВАНИЕМ МИЕЛИНОВОЙ ОБОЛОЧКИ НЕЙРОНОВ,
В ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ 15-ДНЕВНЫХ САМЦОВ МЫШЕЙ**

А.С. Шулюпова, А.А. Лепешко, В.В. Решетников

Научный руководитель: к.б.н., с.н.с. Н.П. Бондарь

Новосибирский государственный медицинский университет,

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

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,

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

E-mail: dshs.anastasia@mail.ru

**THE IMPACT OF EARLY-LIFE STRESS ON THE EXPRESSION OF GENES ASSOCIATED WITH
THE MYELIN SHEATH OF NEURONS IN THE PREFRONTAL CORTEX OF 15-DAY-OLD MALE
MICE**

A.S. Shulyupova, A.A. Lepeshko, V.V. Reshetnikov

Scientific Supervisor: N.P. Bondar, PhD

Novosibirsk State Medical University, Russia, Novosibirsk, Krasny Prospect 52, 630091

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Russia, Novosibirsk,

Prospect Lavrentyeva 10, 630090

E-mail: dshs.anastasia@mail.ru

***Abstract.** The early postnatal period is critical for the development of the central nervous system and can predetermine subsequent behavioral patterns, so stress at this period can lead to long-term consequences in adulthood. In our work, we investigated effects early life stress on myelination. We assessed the expression of the genes associated with the myelin sheath (myelin basic protein - Mbp, myelin-associated oligodendrocyte basic protein - Mobp, proteolipid protein 1 - Plp1, proteolipid in compact myelin - Mal) in frontal cortex of mice. In the groups with a prolonged separation and single separation of the pups from their mothers, we showed decreased gene expression of Mal and trend of decreased gene expression of Mobp and Mbp in the frontal cortex compared to controls, which may indicate a reduction of myelination. Thus, our results show that prolonged separation and single separation of the pups from mothers can lead to a change in the level of myelination, which can disrupt the transfer of impulses in the nerve fiber.*

Введение. Ранний постнатальный период является критическим для развития центральной нервной системы и может предопределять последующие поведенческие паттерны, поэтому стресс в данный период может вызывать отставленные эффекты. Так на животных моделях было показано, что длительное отделение (3 часа) детенышей от матерей приводит к нарушению непрерывности взаимодействия с матерью и вызывает сильный стресс у детенышей. При достижении взрослого возраста у таких животных наблюдают увеличение чувствительности к стрессу, повышенную тревожность и ряд когнитивных расстройств (ухудшение пространственной памяти, способности к распознаванию объектов и др.) [1-3].

Ранее проведенное исследование транскриптома префронтальной коры 15-ти дневных детенышей показало, что данный стресс приводит к изменению экспрессии большого числа генов. Среди них был выделен кластер генов, связанных с формированием миелиновой оболочки аксонов.

Целью данной работы было исследовать изменение экспрессии генов *Mbp*, *Mobp*, *Plp1*, *Mal*, связанных с формированием миелиновой оболочки нейронов, в префронтальной коре 15-ти дневных самцов мышей под влиянием раннего постнатального стресса. Кроме того, было оценено влияние стресса на физиологические (вес животных, вес надпочечников) и биохимические (уровень кортикостерона в крови) параметры.

Материалы и методы. Для получения экспериментального потомства самки мышей (28 животных) были ссажены с самцами в соотношении 3 самки на 1 самца. В помете было от 6 до 9 детенышей. В работе использовались два типа раннего постнатального стресса, проведенного с PND2 по PND14: длительное отделение детенышей от матерей (на 3 ч в день ежедневно, ДО) и однократное отделение (на сутки, ОО). Контрольная группа не отделялась от матерей.

Для оценки экспрессии генов использовали ПЦР в режиме реального времени с использованием Taqman зондов. Мы оценили экспрессию основных генов миелиновой оболочки: *Mbp* кодирует белок, являющийся основным компонентом миелиновой оболочки олигодендроцитов и клеток Шванна в нервной системе, *Mobp* кодирует основной белок олигодендроцитов, ассоциированный с миелином (оценивали с использованием двух пар праймеров, охватывающими все известные транскрипты гена), *Plp1* кодирует протеолипидный белок, который играет важную роль в формировании и поддержании многослойной структуры миелина, *Mal* кодирует протеолипид, участвующий в биогенезе миелина.

У исследуемых групп животных оценивали вес тела и органный индекс (ОИ) надпочечников. Органный индекс рассчитывался по формуле: $ОИ = \text{вес надпочечников} / \text{вес тела} * 100\%$. Уровень кортикостерона измерялся в сыворотке крови детенышей на ПНД 15 методом ИФА.

Результаты. Влияние стресса на физиологические характеристики детенышей. Фактор стресса не оказал достоверного влияния на вес тела детенышей (Рис. 1А). Однако стресс в течение первых двух недель жизни оказал влияние на относительный вес надпочечников: у ОО группы по сравнению с ДО группой у детенышей органный индекс надпочечников оказался достоверно снижен (Рис. 1Б).

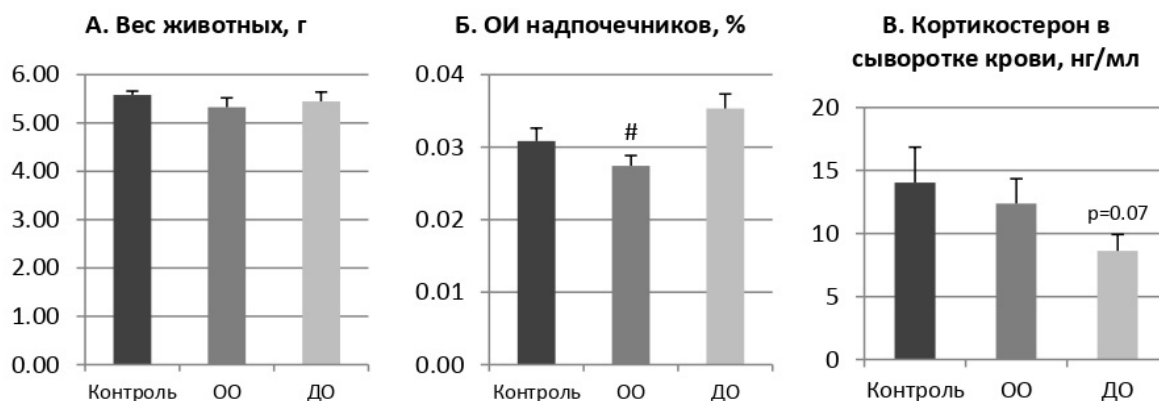


Рис. 1. А. Вес детенышей в возрасте на ПНД 15. Б. Органный индекс надпочечников детенышей на ПНД 15. В. Концентрация кортикостерона в сыворотке крови у детенышей на ПНД15.

Примечание: # - $p < 0,05$ по сравнению с группой «ДО», Fisher LSD-тест

Уровень кортикостерона (Рис. 1В) между разными экспериментальными группами достоверно не различался, однако у мышей из ДО группы прослеживалась тенденция ($p < 0,073$) к снижению уровня по сравнению с контрольной группой.

Влияние стресса на экспрессию генов во фронтальной коре. Анализ экспрессии генов в фронтальной коре показал достоверное снижение уровня экспрессии гена *Mal* в ДО группе по сравнению с ОО группой. В ДО группе, по сравнению с контролем, прослеживается тенденция ($p < 0,075$) к снижению экспрессии гена *Mbp*. Подобная тенденция ($p < 0,077$) прослеживается и у транскрипта ENSMUST00000174193.7 гена *Mobp* (Рис. 2).

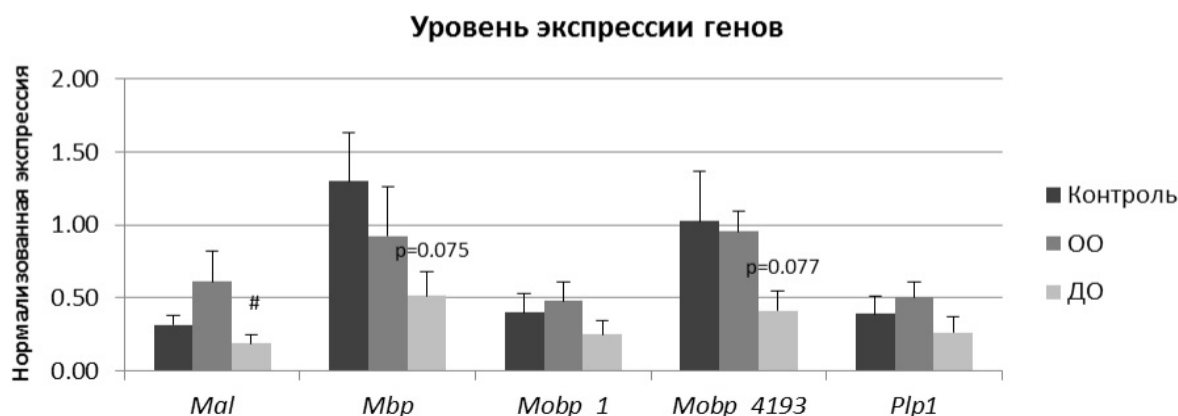


Рис. 2. Изменения уровней экспрессии генов в фронтальной коре.

Примечание: # - $p < 0,05$ по сравнению с группой «ОО», Fisher LSD-тест. Транскрипт ENSMUST00000174193.7 гена *Mobp* представлен как «*Mobp_4193*»

Заключение. Таким образом, наши результаты показывают, что длительное отделение детенышей от матерей приводит к снижению экспрессии генов, продукты которых являются основными компонентами миелиновой оболочки, что может привести к нарушению проведения импульса по нервному волокну. Однократное отделение не вызвало достоверных изменений в исследуемых генах, однако экспрессия гена *Mal* изменяется в противоположную от контроля сторону, чем в группе ДО. Это может свидетельствовать о разной силе воздействия предъявляемых стрессоров.

Работа была поддержана Российским научным фондом, проект 16-15-10131.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bondar N.P., Lepeshko A.A., Reshetnikov V.V. Effects of early-life stress on social and anxiety-like behaviors in adult mice: sex-specific effects // Behavioural Neurology. – 2018. – V. 2. – P. 1–13.
2. Mehta M., Schmauss C. Strain-specific cognitive deficits in adult mice exposed to early life stress // Behavioral Neuroscience. – 2011. – V. 1, № 125. – P. 29–36.
3. Sakhai S.A., Saxton K., Francis D.D. The influence of early maternal care on perceptual attentional set shifting and stress reactivity in adult rats // Developmental Psychobiology. – 2015. – V. 1, № 58. – P. 39–51.

ПРОГРАММА ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ

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

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В ПОЛУЧЕНИИ И ИССЛЕДОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Направление 04.00.00 «Химия», 72 ч.

Модульная структура обучения:

Модуль 1: Новые подходы в получении и исследовании функциональных материалов

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

Профессиональные компетенции, формируемые в результате обучения:

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

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

КОНТАКТЫ

Руководитель программы: Курзина Ирина Александровна, д.ф.-м.н., профессор кафедры физической и коллоидной химии ХФ, директор [САЕ «Институт «Умные материалы и технологии»](#), e-mail kurzina99@mail.ru.

Координатор программы: Мицкевич Юлия Сергеевна, менеджер учебного офиса [САЕ «Институт «Умные материалы и технологии»](#), e-mail yanson1@mail.ru.

АДРЕС

Россия, Томская обл., 634028, г. Томск, ул. А. Иванова, 49 (химический факультет ТГУ). Запись по [ссылке](#).

Научное издание

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

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

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

Издано в авторской редакции

Компьютерная верстка *С. А. Поробова*

Зарегистрировано в Издательстве ТПУ
Размещено на корпоративном портале ТПУ



Издательство

ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ