

*КТМА - филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава РФ
KSMA - Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia*

*ФГАОУ ВО КФУ
Kazan Federal University*

*НО «Ассоциация онкологических учреждений Приволжского округа»
Non-Profit Organization "Association of Oncological Institutions
of the Privolzhsky District"*

**VI Международная научно-практическая конференция
«НОВЫЕ КОНЦЕПЦИИ МЕХАНИЗМОВ ВОСПАЛЕНИЯ,
аутоиммунного ответа и развития опухоли»**

**Казань, Татарстан
31 мая – 2 июня 2017 г.**

**The VIth International Meeting
"New concepts on the mechanisms
of inflammation, autoimmunity and tumorigenesis"**

**Kazan, Tatarstan, Russia
May, 31 – June, 2, 2017**

*Мероприятие проводится при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
Проект № 17-04-20106 Г*

Казань, 2017
Kazan, 2017

УДК 616-006:616.66-002:57
ББК 55.6+53.17

Главный редактор:
д.м.н., член-корр., профессор **Р.Ш. Хасанов**

Редакционный совет:
к.м.н. **М.А. Нюхнин,**
к.б.н. **Р. Аминов,**
к.б.н. **А.Г. Габдулхакова,**
к.м.н. **М.И. Арлеевская,**
к.б.н. **Р.Р. Мифтахова,**
Ю.В. Филина,
к.в.н. **Э.А. Шуралев**

Рецензенты:
д.б.н. **А.А. Набатов,**
д.б.н. **М.Н. Мукминов**

Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунитета и развития опухоли: материалы VI международной науч.-практ. конф. (Казань, 31 мая – 2 июня 2017 г.). – Казань: Участок ротапечной печати НБ КГМА, 2017. – 172 с.

ISBN 978-5-9906679-4-5

ISBN 978-5-9906679-4-5

© КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава России

ОГЛАВЛЕНИЕ
CONTENT

Oncology: mechanisms of cancerogenesis, diagnostic and therapeutic approaches
Онкология: механизмы канцерогенеза, диагностические и терапевтические подходы

THE LYSINE DEMETHYLASE ANDROGEN RECEPTOR EPIGENETIC COREGULATORS AS POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS IN HORMONE REFRACTORY PROSTATE CANCER

Metzler V.M., Jeyapalan J., de Brot S., Robinson B.D., Nilsson E., Whitchurch J., Laursen K.B., Persson J.L., Gudas L.J., Heery D.M, Mongan N.P. 14

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА K-RAS У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Гатауллин И.Г., Гордиев М.Г., Гатауллин Б.И. 15

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОТЫ ОПУХОЛЕЙ ПРЯМОЙ И ОБОДОЧНОЙ КИШКИ

Ильинская О.Н., Гатауллин И.Г., Сафиуллина Д.Р., Мамедзаде К.Р. 16

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕЦИДИВА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Дружков М.О. 17

AUTOANTIGENS AND AUTOANTIBODIES AS POTENTIAL MARKERS OF HUMAN MALIGNANT NEOPLASMS

Kiyamova R.G., Kostianets O.I., Navrsh K.V., Filonenko V.V. 19

АУТОАНТИГЕНЫ И АУТОАНТИТЕЛА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Киямова Р.Г., Костянец О.И., Гавриш К.В., Филоненко В.В. 19

ISOLATION AND INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF ARTIFICIAL MICROVESICLES OF HUMAN TUMOR CELLS
ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИСКУССТВЕННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ ИЗ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Гомзикова М.О., Журавлева М.Н., Мифтахова Р.Р., Архипова С.С., Евтюгин В.Г., Хайбуллина С.Ф., Киясов А.П., Пирссон Дж.Л., Монган Н.П., Пестелль Р.Г., Ризванов А.А. 23

СОСТОЯНИЕ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНОГО ОБМЕНА У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ (НА ПРИМЕРЕ БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ)

Афанасьева З.А., Мухаматгалеева Л.Х., Билалов Ф.С. 25

ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА В ГЕНЕЗЕ ПАПИЛЛОМАТОЗА И РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Нигматуллин Л. 27

CROSS-TALK BETWEEN CANCER CELLS AND IMMUNE CELLS DURING BONE METASTASIS

Persson J.L. 28

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Гарипов К.	28
INTERACTION BETWEEN APOPTOSIS AND AUTOPHGY IN HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA CELLS IN THE CONDITIONS OF METABOLIC STRESS	
Topchu J., Abramova Z.I.	29
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ АПОПТОЗОМ И АУТОФАГИЕЙ В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТРЕССА	
Топчу Ю., Абрамова З.И.	30
NEW OPTIONS OF CANCER DETECTION BY AN EPR/ESR BIOMARKER TEST	
Dmitriev P.	31
НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ РАКА С ПОМОЩЬЮ ЭПР ТЕСТА	
Дмитриев П.	33
SELF-FORMATION ANALYSIS OF BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS AND CELLS OF NEUROBLASTOMA IN CO-CULTURE IN VITRO	
Prudnikov T.S., Kitaeva K.V., Tazetdinova L.G., Gomzikova M.O., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V.	34
АНАЛИЗ САМООРГАНИЗАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ В КО-КУЛЬТУРЕ	
Прудников Т.С., Китаева К.В., Тазетдинова Л.Г., Гомзикова М.О., Ризванов А.А., Соловьева В.В.	35
MULTICELLULAR SPHEROID MODELON EXTRACELLULAR MATRIX ANALOGUE MATRIGEL	
Kitaeva K., Prudnikov T., Tazetdinova L., Gomzikova M., Rizvanov A., Solovyeva V.	36
МОДЕЛЬ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ НА АНАЛОГЕ ТРЕХМЕРНОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МАТРИГЕЛЬ	
Китаева К., Прудников Т., Тазетдинова Л., Гомзикова М., Ризванов А. Соловьева В.	37
БИОИНЖЕНЕРИЯ 3D ОПУХОЛИ IN VITRO	
Рахматуллина А.Р., Мингалеева Р.Н., Мифтахова Р.Р., Ризванов А.А.	38
BIOENGINEERING 3-DIMENSIONAL MODEL OF TUMOR IN VITRO	
Rakhmatullina A.R., Mingaleeva R.N., Miftakhova R.R., Rizvanov A.A.	39
MITOCHONDRIAL INHIBITORS DISPLAY BREAST CANCER STEM CELL TARGETING FEATURES IN HYPOXIC ENVIRONMENT	
Akhunzyanov A.A., Miftakhova R.R., Rizvanov A.A.	40
ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ НА МОДЕЛИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ MCF-7 В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ	
Ахунзянов А.А., Мифтахова Р.Р., Ризванов А.А.	41
CHOLESTEROL REPRESENTS AN ENDOGENOUS SONIC HEDGEHOG SIGNALING PATHWAY ACTIVATOR IN MEDULLOBLASTOMA TUMORIGENESIS	
Gordon R.E., Abramova Z.I.	42
ХОЛЕСТЕРИН ЯВЛЯЕТСЯ ЭНДОГЕННЫМ АКТИВАТОРОМ СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА SONIC HEDGEHOG ПРИ МЕДУЛЛОБЛАСТОМЕ	

Гордон Р.Э., Абрамова З.И.	43
BINASE INDUCES APOPTOSIS OF THE TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER	
Pukhovskaya V., Zelenikhin P.	43
БИНАЗА ИНДУЦИРУЕТ АПОПТОЗ КЛЕТОК ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	
Пуховская В.С., Зеленихин П.В.	45
INFLUENCE OF 6-PHOSPHOGLUCONATEDENHYDROGENASE INHIBITION ON SENSITIVITY OF SCC61 LINE TO CYSPLATINUM	
Minigulova L., Skripova V., Kiyamova R., Serebriisky I.	46
ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВАНИЯ 6-ФОСФОГЛЮКОНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛИНИИ SCC61 К ЦИСПЛАТИНУ	
Минигулова Л.Ф., Скрипова В.С., Киямова Р.Г., Серебрянский И.Г.	47
INVESTIGATION OF THE CYTOKINE PROFILE OF MESENCHYMAL STEM CELLS PRIMED WITH CYSPLATIN AND THEIR ANTITUMOR ACTIVITY IN THE CULTIVATION OF TUMOR CELLS	
Tazetdinova L.G. , Solovyeva V.V., Gafiyatullin A.S., Alekseeva E.A., Martynova E.V., Gomzikova M.O., Rizvanov A.A.	48
ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ЗАГРУЖЕННЫХ ПРЕПАРАТОМ ЦИСПЛАТИН, И ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ В КУЛЬТУРЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК	
Тазетдинова Л.Г., Соловьева В.В., Гафиятуллин А.Ш., Алексеева Е.А., Мартынова Е.В., Гомзикова М.О., Ризванов А.А.	49
Immune system, autoimmune diseases and environment	
Иммунная система, аутоиммунные заболевания и окружающая среда	
MENTAL STRESS IN THE PATHOGENESIS OF RHEUMATOID ARTHRITIS	
Arleevskaya M.I., Tuaeva N.O.	51
МЕНТАЛЬНЫЙ СТРЕСС В ПАТОГЕНЕЗЕ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА	
Арлеевская М.И., Туаева Н.О.	52
THE NUCLEOLUS HYPOTHESIS OF AUTOIMMUNE DISEASES: DISRUPTION OF EPIGENETIC CONTROL DURING CELLULAR STRESS	
Brooks W.	53
EPIGENOME AND SJÖGREN'S SYNDROME	
Renaudineau Y.	54
SHAPING THE SPECTRUM –FROM AUTOINFLAMMATION TO AUTOIMMUNITY	
Hedrich C.M.	54
INTESTINAL DYSBIOTIC TRANSGLUTAMINASES ARE POTENTIAL ENVIRONMENTAL DRIVERS OF SYSTEMIC AUTOIMMUNOGENESIS	
Lerner A., Aminov R., Matthias T.	55
INTERACTION OF GRANULOCYTES WITH ENDOTHELIAL CELLS IN CONDITIONS OF HYPOXIA	

Safronova V.G., Tikhonova I.V., Serov D.A., Filina Yu.V., Astashev M.E., Kosyakova N.I., Chemeris N.K.	56
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГРАНУЛОЦИТОВ С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ	
Сафронова В.Г., Тихонова И.В., Серов Д.А., Филина Ю.В., Асташев М.Е., Косякова Н.И., Чемерис Н.К.	58
OXIDATIVE AND NON-OXIDATIVE MECHANISMS UNDERLYING MACROPHAGE PHAGOCYTIC FUNCTION	
Riazanski V., Nelson D.J.	60
REGULATION OF P53-DEPENDENT GENES EXPRESSION IN MULTIPLE SCLEROSIS THROUGH ACTIVATION OF P53	
Valiullina A.Kh., Khaibullin T.I., Gomzikova M.O., Rizvanov A.A., Bulatov E.R.	61
РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ P53- ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ ПУТЕМ АКТИВАЦИИ БЕЛКА P53 ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ	
Валиуллина А.Х., Хайбуллин Т.И., Гомзикова М.О., Ризванов А.А., Булатов Э.Р.	61
CHANGES IN THE MONOCYTE MEMBRANE INDUCED BY PLATELET FACTOR 4-CONTAINING IMMUNE COMPLEXES	
Andrianova I.A., Rauova L., Litvinov R. I.	62
ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАНЫ МОНОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ФАКТОР 4	
Андрианова И.А., Рауова Л., Литвинов Р.И.	63
PLATELET ACTIVATION AND APOPTOSIS INDUCED BY THE IMMUNE COMPLEX IgG/PLATELET FACTOR 4 AS THE PATHOGENIC MECHANISMS IN HEPARIN-INDUCED THROMBOCYTOPENIA	
Nevzorova T.A., Mordakhanova E.R., Ponomareva A.A., Andrianova I.A., Litvinov R.I.	65
АКТИВАЦИЯ И АПОПТОЗ ТРОМБОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИММУННОГО КОМПЛЕКСА IgG/ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ФАКТОР 4 КАК ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕПАРИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИИ	
Невзорова Т.А., Мордаханова Э.Р., Пономарева А.А., Андрианова И.А., Литвинов Р.И.	66
KINETICS AND NANOMECHANICS OF SINGLE-MOLECULE INTERACTIONS OF DNA WITH A MONOCLONAL ANTI-DNA ANTIBODY THAT INDUCES SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS	
Nevzorova T.A., Lomakin Y.A., Zhao Q.K., Purohit P.K., Litvinov R. I.	67
КИНЕТИКА И НАНОМЕХАНИКА ЕДИНИЧНЫХ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДНК С МОНОКЛОНАЛЬНЫМ АНТИ-ДНК-АНТИТЕЛОМ, ВЫЗЫВАЮЩИМ СИСТЕМНУЮ КРАСНУЮ ВОЛЧАНКУ	
Невзорова Т.А., Ломакин Я.А., Zhao Q.K., Purohit P.K., Литвинов Р.И.	68
CHANGES IN THE CYTOKINE PROFILE AFTER GENE-CELL THERAPY IN TRAUMATIC DISEASE OF SPINAL CORD	
Akhmetzyanova E.R., Mukhamedshina Y.O., Martynova E.V., Galieva L.R., Zhuravleva M.N.	69

ИЗМЕНЕНИЯ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ НА ФОНЕ ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СПИННОГО МОЗГА Ахметзянова Э.Р., Мухамедшина Я.О., Мартынова Е.В., Галиева Л.Р., Журавлева М.Н.	70
FIBER STRUCTURE AND LYTIC RESISTANCE OF FIBRIN IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS Nabiullina R.M., Shakurova M.A., Maksudova A.N., Zubairova L.D., Litvinov R.I. ...	71
СТРУКТУРА ВОЛОКОН И ЛИТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ФИБРИНА ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ Набиуллина Р.М., Шакурова М.А., Максудова А.Н., Зубаирова Л.Д., Литвинов Р.И.	71
ACTIVATED MONOCYTES ENHANCE CONTRACTION OF BLOOD CLOTS: A LINK BETWEEN INFLAMMATION AND BLOOD COAGULATION Peshkova A.D., Minh G.L., Andrianova I.A., Litvinov R.I.	72
АКТИВИРОВАННЫЕ МОНОЦИТЫ УСИЛИВАЮТ КОНТРАКЦИЮ СГУСТКОВ: СВЯЗЬ ВОСПАЛЕНИЯ И СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ Пешкова А.Д., Жанг Л.М., Андрианова И.А., Литвинов Р.И.	73
ANALYSIS OF SERUM CYTOKINES AND CHEMOKINES LEVELS OF MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS AFTER THE ADMINISTRATION OF XEMYS Okunola O.D., Aleksandrova N.M.	74
АНАЛИЗ УРОВНЯ СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ХЕМЫС Окунола О. Д., Александрова Н.М.	75
THE ASSOCIATION OF MITOCHONDRIAL HAPLOTYPES WITH RHEUMATOID ARTHRITIS SEVERITY Larionova R., Shafigullina A.Z., Ismagilova R., Varfolomeev A., Kravtsova O., Arleevskaya M.	76
IMPACT OF TOXOPLASMOSIS ON THE SEVERITY AND ACTIVITY OF RHEUMATOID ARTHRITIS Nadi A., Shuralev E.A., Takashima Ya., Arleevskaya M.I.	77
ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИИАЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР С ФИЗИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ И СПОРТИВНОЙ УСПЕШНОСТЬЮ Валеева Е.	78

New approaches for therapy and diagnostics

Новые подходы в терапии и диагностике заболеваний

THE VARIANCE OF INFLAMMATION MARKERS IN LIVER DISEASE INDUCED BY CCl ₄ AND CORRECTION BY L-ASCORBAT 1-(2-HYDROXYETHYL)-4,6-DIMETHYL-1,2-DIHYDROPYRIMIDIN-2-ON Vyshtakalyuk A.B., Diabankana R.G.K., Parfenov A.A., Gumarova L.F., Nazarov N.G., Zobov V.V., Bushmeleva K.N., Sudakov I.A., Galyametdinova I.V., Semenov V.E. ...	79
ИЗМЕНЕНИЕ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ CCl ₄ И КОРРЕКЦИИ ВЕЩЕСТВОМ L-АСКОРБАТ 1-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)-4,6-ДИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОПИРИМИДИН-2-ОНА	

Выштакалюк А.Б., Диабанкана Р.Ж.К., Парфенов А.А., Гумарова Л.Ф., Назаров Н.Г., Зобов В.В., Бушмелева К.Н., Судаков И.А., Галяметдинова И.В., Семенов В.Э.....	80
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОСФОРСОДЕРЖАЩИХ АНАЛОГОВ ПРИРОДНЫХ АЛКАЛОИДОВ КОНВОЛЮТАМИДИНОВ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ НА МОДЕЛИ КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННОГО ОТЕКА	
Ленина О.А., Выштакалюк А.Б., Гумарова Л.Ф., Татаринов Д.А., Зобов В.В., Миронов В.Ф.	82
STUDY OF EFFICIENCY OF PHOSPHORUS-CONTAINING ANALOGUES OF NATURAL ALCALOIDS CONVOLUTAMYDINES AS ANTI-INFLAMMATORY AGENT IN MODEL OF CARRAGEENAN-INDUCED EDEMA	
Lenina O.A., Vyshkakalyuk A.B., Gumarova L.F., Tatarinov D.A., Zobov V.V., Mironov V.F.	84
POTENTIAL USE OF FLUORIDE NANOPARTICLES AND RARE EARTH DOPED FLUORIDE NANOPARTICLES (PRF ₃ , LAF ₃ , PR:LAF ₃) IN BIOMEDICINE (PHOTODYNAMIC THERAPY): CYTOTOXICITY AND PHOTOTOXICITY	
Pudovkin M.S., Zelenikhin P.V., Krashennicova A.O., Nizamutdinov A.S., Ferraro A., Semashko V.V., Pavlov V.V.	85
ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ PRF ₃ , LAF ₃ , PR:LAF ₃ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ	
Пудовкин М.С., Зеленихин П.В., Павлов В.В., Морозов О.А., Лукинова Е.В., Коряковцева Д.А., Семашко В.В.	86
PRACTICAL APPLICATION OF BIACORE T200 BIOSENSOR IN BIOMEDICAL RESEARCH	
Aleksandrova N.M.	87
ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БИОСЕНСОРА BIACORE T200 В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ	
Александрова Н.М.	88
ANALYSIS OF ATOMIC FLUCTUATIONS IN THE DNA-ANTIBODY COMPLEXES	
Akberova N.I., Zhmurov A.A., Nevzorova T.A., Litvinov R.I.	89
АНАЛИЗ АТОМНЫХ ФЛУКТУАЦИЙ В КОМПЛЕКСАХ ДНК-АНТИТЕЛО	
Акберова Н.И., Жмуров А.А., Невзорова Т.А., Литвинов Р.И.	90
CONFORMATIONAL CHANGES IN CYCLOSPORIN INDUCED BY SOLVENT EFFECTS AND METAL IONS	
Efimov S.V., Zgadzay Yu.O., Slivka A.V., Mikheeva O.G., Klochkov V.V.	91
ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ ЦИКЛОСПОРИНА, ВЫЗВАННЫЕ ВЛИЯНИЕМ РАСТВОРИТЕЛЯ И ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ	
Ефимов С.В., Згадзай Ю.О., Сливка А.В., Михеева О.Г., Клочков В.В.	92
PRODUCTION OF RECOMBINANT LENTIVIRUSES ENCODING ANTI-TUMOUR HUMAN CYTOKINES	
Chulpanova D.S., Kolobynina K.G., Solovyeva V.V., Rizvanov A.A.	93
СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ, КОДИРУЮЩИХ ГЕНЫ ЦИТОКИНОВ ЧЕЛОВЕКА	

Чулпанова Д.С., Колобынина К.Г., Соловьева В.В., Ризванов А.А.	94
CONFORMATIONAL PREFERENCE OF SOME NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS	
Khodov I.A., Efimov S.V., Belov K.V., Klochkov V.V., Kiselev M.G.....	95
КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПРЕДПОЧТЕНИЯ НЕКОТОРЫХ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ	
Ходов И.А., Ефимов С.В., Белов К.В., Клочков В.В., Киселев М.Г.	96
SPATIAL STRUCTURE OF THE COMPLEX OF AMYLOID PEPTIDE A β 13-23 WITH Mn ²⁺ AND Co ²⁺ BASED ON NMR DATA	
Abdrakhmanov R Zh., Blokhin D.S., Usachev K.S., Klochkov V.V.....	97
ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ КОМПЛЕКСА БЕТА-АМИЛОИДА A β 13-23 С ИОНАМИ Mn ²⁺ и Co ²⁺ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ЯМР	
Абдрахманов Р.Ж., Блохин Д.С., Усачев К.С., Клочков В.В.	99
THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF 1,3-BIS(ALKYL)-6-METHYLURACIL DERIVATIVES WITH 1,2,3-AND 1,2,4- TRIAZOLIUM MOIETIES IN ALKYL CHAINS	
Strobykina A.S., Semenov V.E., Krylova E.S., Kulik N.V., Voloshina A.D.	100
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 1,3-БИС(АЛКИЛ)-6-МЕТИЛУРАЦИЛОВ, СОДЕРЖАЩИХ 1,2,3- И 1,2,4-ТРИАЗОЛИЕВЫЕ ФРАГМЕНТЫ В АЛКИЛЬНЫХ ЦЕПОЧКАХ	
Стробыкина А.С., Семенов В.Э., Крылова Е.С., Кулик Н.В., Волошина А.Д.	102
GENERATION OF PLASMID DNA EXPRESSING SPECIES-SPECIFIC HORSE VEGF164 AND FGF2 FACTORS FOR GENE THERAPY, AND CLINICAL APPLICATION FOR DIRECT GENE THERAPY FOR THE TREATMENT OF EQUINE TENDINITIS AND DESMITIS	
Litvin Y.A., Kovac M., Aliev R.O., Zakirova E.Yu., Zhuravleva M.N., Kiyasov A.P., Rizvanov A.A.	104
СОЗДАНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ВИДОСПЕЦИФИЧНЫЕ ДЛЯ ЛОШАДИ ФАКТОРЫ VEGF164 И FGF2	
Литвин Я.А., Закирова Е.Ю., Журавлева М.Н., Ризванов А.А.....	105
ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF NOVEL 5(S)-MENTHYLOXY DERIVATIVES OF 2(5H)-FURANONE	
Cong H.H., Sibgatullina R.R., Khabibrakhmanova A.M., Kurbangalieva A.R., Ziganshina L.E.	106
ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ 5(S)-МЕНТИЛОКСИПРОИЗВОДНЫХ 2(5H)-ФУРАНОНА.....	
Конг Х.Х., Сибгатуллина Р.Р., Хабибрахманова А.М., Курбангалиева А.Р., Зиганшина Л.Е.....	108
ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК МИНЕРАЛОМ ГАЛЛУАЗИТОМ НА ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ	
Рожина Э.В., Фахруллин Р.Ф.....	109
METHOD OF MEDICAL IMPLANTS POLLUTION ASSESSMENT USING ATOMIC FORCE MICROSCOPE	

Акхатова F.S., Kibardina M.L., Trizna E.Y., Kayumov A.R., Fakhrullin R.F.....	111
МЕТОД ОЦЕНКИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИМПЛАНТАТОВ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	
Ахатова Ф.С., Кибардина М.Л., Тризна Е.Ю., Каюмов А.Р., Фахруллин Р.Ф.....	112
BIOPOLIMERIC NANOSTRUCTURED COMPOSITES IN REGENERATION OF BONE DEFECTS	
Naumenko E.A., Guryanov I.D., Zakirova E.Yu., Fakhrullin R.F.....	114
БИОПОЛИМЕРНЫЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ КОМПОЗИТЫ В ВОСТАНОВЛЕНИИ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ	
Науменко Е.А., Гурьянов И.Д., Закирова Е.Ю., Фахруллин Р.Ф.....	115
Microbiome and infectious diseases	
Микробиом и инфекционные заболевания	
HORIZONTAL GENE EXCHANGE IN THE GUT	
Lerner A., Aminov R. , Matthias T.....	117
METCHNIKOFF, PROBIOTICS AND HORIZONTAL GENE EXCHANGE: THE NEED FOR CONTINUOUS REFINEMENT	
Lerner A., Aminov R., Matthias T.....	118
BACTERIAL TRANSLOCATION FROM THE GUT OF MICE C57BL/6 IN THE COURSE OF EXPERIMENTAL COLITIS	
Khomyakova T.I., Magomedova A.D., Kozlovskaya G.V., Kozlovsky Yu.E., Khomyakov Yu.N.....	119
БАКТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТРАНСЛОКАЦИЯ ИЗ ТОЛСТОЙ КИШКИ МЫШЕЙ C57BL/6 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ	
Хомякова Т.И., Магомедова А.Д., Козловская Г.В., Козловский Ю.Е., Хомяков Ю.Н.	120
МЕДИЦИНСКАЯ ПИЯВКА HIRUDO MEDICINALIS КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГИПЕРТРАНСЛОКАЦИИ БАКТЕРИЙ-СИМБИОНТОВ AEROMONAS SPP	
Хомякова Т.И.....	123
GAMMA-IRRADIATED BIFIDOBACTERIA ESTABLISH A PROTECTIVE EFFECT ON MICE TO EXPERIMENTAL RADIATION EXPOSURE	
Sychev K.V., Nizamov R.N.....	125
ОБЛУЧЕННАЯ КУЛЬТУРА BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM ФОРМИРУЕТ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛУЧЕВОЙ БОЛЕЗНИ	
Сычев К.В., Низамов Р.Н.	125
SPECTRUM AND ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES IN FECES OF PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES	
Zinkevich O.D., Mukhametova D.D., Saphina N.A., Koporulina M.O.....	127
СПЕКТР И АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ФЕКАЛИЯХ ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА	
Зинкевич О.Д., Мухаметова Д.Д., Сафина Н.А., Копорулина М.О.	128

SPECTRUM OF PROTEOLYTIC ENZYMES IN BLOOD SERUM AND COPROFILTRATES IN PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS Zinkevich O.D., Saphina N.A., Chikaev V.F., Malkov I.S., Koporulina M.O., Aidarov A.R.....	129
СПЕКТР ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ И ФЕКАЛИЯХ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ Зинкевич О.Д., Сафина Н.А., Чекаев В.Ф., Копорулина М.О., Айдаров А.Р.....	130
ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF THE ERADICATING HELICOBACTER PYLORI (MAASTRICHT V - 2016) Kugler T.E.....	131
ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ЭРАДИКАЦИИ HELICOBACTER PYLORI (МААСТРИХТ V - 2016) Куглер Т.Е.	133
EFFECTS OF RADIOTHERAPY ON LACTOBACILLI OF HUMAN NORMAL GUT MICROBIOTA.....	135
Do T.D., Rychakova Zh., Ismagilova R.K., Goenko I.A., Bukhmin V.S., Yarullina D.R.....	135
ВЛИЯНИЕ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ НА ЛАКТОБАЦИЛЛЫ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА До Т.З., Рычакова Ж.С., Исмагилова Р.К., Гоенко И.А., Бухмин В.С., Яруллина Д.Р.....	136
PYROSEQUENCING ANALYSIS OF ORAL MICROBIOTA FROM PATIENTS WITH PRIMARY SJÖGREN'S SYNDROME Jehan Alam, Youngnim Choi.....	137

Infectious diseases

Инфекционные заболевания

ZIKV INFECTION REGULATES INFLAMMASOMES PATHWAYS FOR REPLICATION IN MONOCYTES Khaiboullina S.F., Sarkar R., Gorzalski A., Jeor St., Verma S.C.....	139
SEROLOGICAL ACTIVITY OF VARIOUS COMPONENTS OF THE RABIES VIRUS ANTIGEN Efimova M.A., Khaertynov K.S., Avzalova A.F., Chernov A.N., Akhmadeev R.M., Nasirov Sh.M., Nikitin A.I.	140
СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ АНТИГЕНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА Ефимова М.А., Хаертынов К.С., Авзалова А.Ф., Чернов А.Н., Ахмадеев Р.М., Насыров Ш.М., Никитин А.И.	140
SECRETED AND CELL WALL ANTIGENS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FOR EVALUATION OF SPECIFIC HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY Shuralev E.A., Mukminov M.N., Khaertynov K.S., Singh M.....	142
TIRAP AND TLR2POLYMORPHISMS REDUCE THE RISK OF PULMONARY TUBERCULOSIS AMONG THE KAZAKHS	

Tarabayeva A., Bitanova E., Abilbayeva A., Amirbekov A.	143
TUBERCULOSIS IN KAZAKHSTAN: CURRENT CHALLENGES	
Bitanova E., Tarabayeva A., Rakisheva A., Nazhmedenova A.	144
ТУБЕРКУЛЁЗ В КАЗАХСТАНЕ – СОВРЕМЕННЫЕ ВЫЗОВЫ	
Битанова Э.Ж., Тарабаева А.С., Ракишева А.С., Нажмеденова А.Г.	146
ИНТОКСИКАЦИЯ КАДМИЕМ ПОДАВЛЯЕТ СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ	
Валеева А.Р.	147
ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК МИКОБАКТЕРИЙ В ПОМЕЩЕНИИ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАРАЖЕНИЯ ЖИВОТНЫХ ДО И ПОСЛЕ ДЕЗИНФЕКЦИИ	
Хаммадов Н.И., Осянин К.А.	148
ADHESION OF TOXOPLASMA GONDII TACHYZOITE-INFECTED VEHICLE LEUKOCYTES TO CAPILLARY ENDOTHELIAL CELLS TRIGGERS TIMELY PARASITE EGRESSION	
Takashima Ya.	150
CLINICAL FEATURES OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME CAUSED BY GENOTYPE HANTAVIRUSES PUUMALA, CIRCULATING IN THE REPUBLIC OF TATARSTAN	
Shakirova V.G., Davidiyuk Y.N., Kabwe E., Martynova E.V., Ismagilova R.K., Morzunov S.P., Khaertynova I.M., Khaiboullina S.F., Rizvanov A.A.	151
КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ, СВЯЗАННЫЕ С ГЕНОТИПОМ ШТАММОВ ХАНТАВИРУСА PUUMALA, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН	
Шакирова В.Г., Давидюк Ю.Н., Кабве Э., Мартынова Е.В., Исмагилова Р.К., Хаертынова И.М., Хайбуллина С.Ф., Морзунов С.П., Ризванов А. А.	152
SERUM CYTOKINE PROFILES DIFFERENTIATING HFRS AND HPS	
Khaiboullina S.F.	154
EXPERIENCE OF TREATMENT BY PARITAPREVIR/OMBITASVIR/RITONAVIR AND DASABUVIR OF PATIENTS WITH LIVER CIRRHOSIS IN THE OUTCOME OF CHRONIC VIRAL HEPATITIS C	
Khaertynova I.M., Gaifullina E.G., Sozinova Y.M.	155
ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕПАРАТАМИ ПАРИТАПРЕВИР/ОМБИТАСВИР/ РИТОНАВИР И ДАСАБУВИР У ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ В ИСХОДЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С	
Хаертынова И.М., Гайфуллина Э.Г., Созинова Ю.М.	156
MOLECULAR-GENETIC PRECEDERS OF RECURRENCE OF WOLVOVAGINAL CANDIDIASIS	
Donnikov A.	157
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ РЕЦИДИВИРОВАНИЯ ВУЛЬВОВАГИНАЛЬНОГО КАНДИДОЗА	
Донников А.	158

EFFICACY OF ANTI-RABIES VACCINE IN COMBINATION WITH XYMEDONEHYDROCHLORIDE IN RABBITS WITH INDUCED IMMUNOSUPPRESSION	
Kalmykova Y., Akhmadeev R., Aleeva Z., Yarullina G., Chernov A., Efimova M.....	159
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КСИМЕДОНГИДРОХЛОРИДА ПРИ АНТИРАБИЧЕСКОЙ ВАКЦИНАЦИИ КРОЛИКОВ НА ФОНЕ ИММУНОДЕПРЕССИИ	
Калмыкова Ю.В., Ахмадеев Р.М., Алеева З.З., Яруллина Г.М., Ефимова М.А., Чернов А.Н.	160
PATHOLOGICAL CHANGES IN MINK CAUSED BY H. PYLORI INFECTION	
Shamaev N.D., Nurgaliev F.M., Raginov I.S.	162
ПАТОЛОГОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У НОРОК, СВЯЗАННЫЕ С ИНФЕКЦИЕЙ HELICOBACTER PYLORI	
Шамаев Н.Д., Нургалиев Ф.М., Рагинов И.С.	163
INTEFERRING WITH HANTAVIRUS INTRACELLULAR TRANSPORT RESULTS IN DECREASED CYTOKINE PRODUCTION	
Muyangwa M., Garanina E.E., Martynova E.V., Rizvanov A.A., Khaiboullina S.F. Муйангва М., Гаранина Е.Е., Мартынова Е.В., Ризванов А.А., Хайбуллина С.Ф.	166
BIOMEDICAL ENTREPRENEURSHIP	
Wren A.	167

*Oncology: mechanisms of cancerogenesis, diagnostic
and therapeutic approaches*

*Онкология: механизмы канцерогенеза, диагностические
и терапевтические подходы*

**THE LYSINE DEMETHYLASE ANDROGEN RECEPTOR EPIGENETIC
COREGULATORS AS POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS IN
HORMONE REFRACTORY PROSTATE CANCER**

Metzler V.M.^{1,3}, Jeyapalan J.¹, de Brot S.¹, Robinson B.D.²,
Nilsson E.¹, Whitchurch J.^{1,3}, Laursen K.B.⁴, Persson J.L.^{4,5},
Gudas L.J.⁴, Heery D.M.³, Mongan N.P.^{1,4}

¹ Faculty of Medicine and Health Sciences, School of Veterinary Medicine and
Science, University of Nottingham, United Kingdom;

² Department of Pathology, Weill Cornell Medicine, NY, USA;

³ School of Pharmacy, University of Nottingham, United Kingdom;

⁴ Department of Pharmacology, Weill Cornell Medicine, NY, USA;

⁵ Clinical Research Center, Lund University, Malmö, Sweden

Advanced prostate cancer (PCa) is treated by androgen deprivation therapies (ADT). However, hormone refractory PCa (HRPC) that escapes androgen dependency and is incurable commonly arises within ~18 months of ADT use. There is therefore an urgent need for new approaches to treat HRPC. The genomic actions of androgens are mediated by the androgen receptor in complex with multiple enzymatically diverse chromatin modifying coregulators. We and others have identified lysine demethylases (KDMs) as important mediators of androgen signaling and PCa recurrence. Increased expression of KDM1A/LSD1 is associated with poor outcomes and PCa recurrence. Pharmacologic inhibitors of KDM1A block androgen induced transcription and inhibit PCa cell proliferation. We recently found that androgen induced miR137 acts as a suppressor of an extended network of transcriptional coregulators, including KDM1A, KDM5B and KDM7A in normal prostate cells. Loss of miR137 in PCa contributes to an increase in expression of an extended network of AR-coregulators, including KDM1A, KDM5B and KDM7A. Here we report that androgen significantly induces KDM5B and KDM7A expression in hormone dependent LNCaP cells. Furthermore, siRNA-mediated functional depletion of KDM5B and KDM7A impairs androgen induction of the prostate-specific antigen KLK3/PSA and the pro-angiogenesis factor, VEGFA. We next examined the function of KDM7A in androgen signaling in hormone refractory LNCaP: C4-2 and PC3 cells. Depletion of KDM7A also blocks androgen induction of KLK3/PSA and VEGFA expressions in LNCaP: C4-2. Finally we examined KDM7A expression in PCa specimens and correlate expression with key clinical parameters. Collectively our work supports a role for lysine demethylase coregulators in both

androgen dependent and refractory PCa. Thus KDMs represents a novel potential pharmaco-target to inhibit androgen signaling in hormone dependent and refractory contexts and thereby circumvent resistance to existing ADTs.

Funding: We gratefully acknowledge the financial support of the BBSRC doctoral training program, Prostate Cancer UK and the University of Nottingham
Statement of conflict of interests: The authors have no conflicts of interest relevant to the current study.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА K-RAS У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Гатауллин И.Г., Гордиев М.Г., Гатауллин Б.И.

КГМА - филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО

Минздрава РФ, Казань, Россия

ГАУЗ РКОД МЗ РТ, Казань, Россия

Актуальность. Одной из важнейших соматических мутаций, обнаруженных в опухолях толстой кишки, является мутация в гене KRAS, выявляемая с частотой от 30% до 50%. Мутация в гене KRAS может стать новым фактором прогноза в рамках даже одной и той же стадии заболевания.

Цель исследования: Выявление частоты мутации в гене KRAS у больных колоректальным раком в Республике Татарстан, и оценка влияния мутации на течение и прогноз заболевания.

Материалы и методы: В исследование включены 120 больных колоректальным раком, получивших комбинированное лечение в ГАУЗ «РКОД МЗ Республики Татарстан». Пациентам был проведен генетический анализ на наличие мутации в гене KRAS на материале, полученном в результате оперативного вмешательства.

Результаты собственных исследований: Из 120 пациентов у 35 (26,7%) выявлена мутация в гене KRAS, у 85 пациентов имелся «дикий» тип гена KRAS. При этом 25 мутаций обнаружено в 12 и 13 кодонах, 7 мутаций в 61 кодоне и 3 – в 146 кодоне. Результаты исследования показали, что у русского населения мутантный тип гена KRAS выявляется чаще (в 38,9%) чем у татарского населения (в 21,2%) ($p=0,045$). Мутация в гене KRAS чаще встречалась у женщин чем у мужчин (37,7% и 20,3% соответственно). Данные зависимости значимы ($p=0,045$). Опухоли толстой кишки с мутантным геном KRAS более склонны к лимфогенному метастазированию (в 54,2 %), чем опухоли с «диким» типом (в 45,8%), что косвенно свидетельствует о более агрессивном течении опухолевого процесса при мутантном типе гена ($p = 0,004$). Больные с мутантным типом гена чаще имеют отдаленные синхронные метастазы (в 63,6%), чем больные с «диким» типом (в 36,4%) Данная зависимость является статистически значимой ($p=0,0001$). Годичная выживаемость пациентов с

«диким» типом гена KRAS составила 96,5%, с мутантным типом гена 88,6% ($p=0,0012$).

Заключение. Таким образом, опухоль с мутантным типом гена K-RAS обладает агрессивным течением и высоким потенциалом к метастазированию. Мутация гена в опухоли может служить независимым значимым прогностическим признаком для оценки течения и исхода заболевания.

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОТЫ ОПУХОЛЕЙ ПРЯМОЙ И ОБОДОЧНОЙ КИШКИ

Ильинская О.Н.¹, Гатауллин И.Г.²,
Сафиуллина Д.Р.¹, Мамедзаде К.Р.¹

¹ ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

² КГМА - филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава РФ, Казань, Россия

Актуальность. Для ряда заболеваний немикробной этиологии обнаружена сложная взаимосвязь между определенными инфекциями и некоторыми формами рака.

Целью исследования явилось выделение и характеристика культивируемых факультативно аэробных бактерий из биоптатов слизистой толстой кишки. Материалы и методы. Изучены биоптаты опухоли и неизменной слизистой ободочной и прямой кишки у 50 больных колоректальным раком. Проводили суспензирование секционного материала и его посев на питательные среды с последующей дифференциацией выделенных бактерий.

Результаты исследования. Анализ микрофлоры биоптатов опухоли и непораженной слизистой методами классической микробиологии позволил выделить доминирующие группы бактерий, характерные для ткани опухоли, и неповрежденного эпителия. Установлено, что для неповрежденного эпителия характерно преобладание грамположительных палочек (73,3%) и кокков (20,0%), в то время как ткань опухоли была в основном обсеменена грамотрицательными палочками (76,2%). Отмечено, что грамположительные кокки обнаруживаются только в образцах неповрежденного эпителия. Для неповрежденного эпителия характерно присутствие бактерий семейств *Lactobacillaceae* и *Enterobacteriaceae*, не обладающих антагонистической и гемолитической активностями, но способных продуцировать секретлируемые рибонуклеазы. Среди представителей семейства *Staphylococcaceae*, высеянных только со здорового эпителия, более половины – гемолитики, не проявляющие антагонистическую активность по отношению к *Escherichia coli*. Доля бактерий с антагонистическими свойствами и гемолитиков семейства *Enterobacteriaceae* на малигнизированном эпителии значительно выше, чем на неповрежденном.

Заключение. В зоне роста колоректальной карциномы наблюдается смена ассоциированных с эпителием интраэпителиальных микробных сообществ. При этом возрастает доля представителей *Enterobacteriaceae*, обладающих гемолитической, экзорибонуклеазной активностью, и снижется доля лактобацилл. Таким образом, бактериальная микрофлора трансформированной ткани может служить маркером патофизиологических изменений эпителия кишечника при колоректальном раке.

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕЦИДИВА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Дружков М.О.

КГМА - филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава РФ, Казань, Россия,
ГАУЗ РКОД МЗ РТ, Казань, Россия

Цель исследования: разработка тактики комплексного лечения локальных рецидивов с учетом изменения иммунофенотипов первичной опухоли и локального рецидива рака молочной железы (РМЖ). Исследовано изменение иммунофенотипа РМЖ от первичной опухоли к локальному рецидиву. В зависимости от указанных изменений, а также от клинической формы рецидивной опухоли разработан алгоритм лечения локальных рецидивов РМЖ.

Материалы и методы исследования. По данным Республиканского клинического онкологического диспансера Республики Татарстан за период с 2000 по 2011 гг. прооперировано 5 808 пациентов с диагнозом РМЖ, среди них пациентов с локальными рецидивами – 108, что составляет 1,85 % от общего количества пациентов, получавших хирургическое лечение по поводу первичного РМЖ.

Все пациенты с резектабельными формами локальных рецидивов подвергались оперативному лечению. Объем хирургического вмешательства зависел от размеров рецидивной опухоли и был представлен несколькими вариантами: иссечение рецидива в области послеоперационного рубца или на передней грудной стенке (55,2 %), ампутация резецированной молочной железы (простая мастэктомия) после ОСО (30,5 %), повторная ОСО (в сочетании с пластической коррекцией и без) (11,4 %), иссечение локорегионарного рецидива (2,9 %).

Все препараты подвергались гистологическому и ИГХ-исследованию, проводимому с использованием моноклональных антител к эстрогеновым и прогестероновым рецепторам, белку онкогена HER2/neu. Полученные результаты подлежали сравнению с соответствующими показателями первичных опухолей у данных пациентов.

Результаты исследования и их обсуждение. Изменения иммунофенотипов локальных рецидивов РМЖ произошли как за счет увеличения или уменьшения экспрессии рецепторов стероидных гормонов, так и за счет изменения экспрессии онкогена Her2/neu. Таким образом, установлено, что фенотипические признаки первичной опухоли и локального рецидива по основным ИГХ-показателям отличаются в 57,69 % случаев. Согласно нашим наблюдениям, изменение от гормононегативных опухолей к гормонопозитивным было в 46,7 % случаев. Фенотип гормононегативных опухолей поменялся в 40 % наблюдений. Изменения экспрессии онкогена Her2/neu наблюдали в 13,3 % случаев. Опухоли с фенотипом Эр-, Пр-, neu+++ (Her2-тип) не изменили своих молекулярно-генетических свойств. Трижды негативные опухоли поменяли молекулярно-генетические свойства у трети пациентов. У подавляющего большинства опухолей с иммунофенотипом Эр+, Пр-, neu- (75 %) снизилась экспрессия рецепторов стероидных гормонов, в результате чего они стали трижды негативными. То же произошло и с опухолями с более выраженной экспрессией рецепторов стероидных гормонов (фенотип Эр+, Пр+, neu-). Но только небольшое количество таких опухолей (25%), ввиду высокой экспрессии, успели поменять свой статус в процессе лечения. У опухолей с люминальным молекулярно-генетическим подтипом В (Эр+, Эр-, neu+++ и Эр+, Пр+, neu+++) изменился фенотип не только за счет снижения или увеличения экспрессии рецепторов стероидных гормонов, но и за счет снижения экспрессии белка онкогена Her/2-neu.

Выводы. В результате многочисленных международных многоцентровых рандомизированных исследований разработаны единые стандарты лечения пациентов с первичным РМЖ, которых должны придерживаться онкологи, планируя тактику лечения. Что касается локальных рецидивов РМЖ, тактика лечения должна быть строго индивидуальна для каждого пациента, должна обязательно иметь комплексный подход к лечению, включающий в себя ХТ, эндокринотерапию, хирургическое и лучевое лечение. Перед началом системного лечения требуется обязательная верификация рецидивной опухоли.

Резектабельные опухоли должны быть исследованы после повторного оперативного вмешательства, нерезектабельные должны подвергаться трепанобиопсии или эксцизионной биопсии с последующим гистологическим, а также ИГХ-исследованием рецидивной опухоли.

Внедрение в клиническую практику разработанного алгоритма позволит улучшить отдаленные результаты комплексного лечения локальных рецидивов РМЖ.

AUTOANTIGENS AND AUTOANTIBODIES AS POTENTIAL MARKERS OF HUMAN MALIGNANT NEOPLASMS

Kiyamova R.G.¹, Kostianets O.I.², Havrish K.V.¹, Filonenko V.V.².

¹Kazan federal university, Kazan, Russia

²Institute of molecular biology and genetic NASU, Kyiv, Ukraine;

Immune system is a sensor of molecular abnormalities in tumor cell, while autoantibodies of oncological patients could be used for identification of potential markers of human malignant neoplasms - tumor-associated autoantigens (TAA).

For identification of colon, thyroid and medullary breast carcinomas autoantigens SEREX (Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries) method was used and 81 autoantigens were identified. Analysis their immunoreactivity with sera of patients with different types of cancer revealed 32 potential tumor-associated autoantigens that did not react with sera of healthy donors.

Subsequent analysis of immunoreactivity of 12 potential TAA in sera of cancer patients of different histological types by ELISA and studying their localization and expression profile in breast tumors taking into account histological and molecular-biological features allowed us to identify several potential diagnostic, prognostic and predictive markers of breast cancer. Of greatest interest are the 6 autoantigens including RAD50, NY-CO-58, PARD3, SAP30BP, SPP1 and NY-BR-62 which enables to differentiate healthily and illness women with 70% sensitivity and 91% specificity. This autoantigen's combination (panel) is prototype of a minimally invasive test system for breast cancer diagnostic among women. Further analysis of literature data and *RAD50* gene expression profile in breast cancers let us assume that RAD50 is potential predictive marker of response to cisplatin therapy.

Identified autoantigens could be used not only to establish diagnostic systems and drugs based on them but for studying and understanding of mechanisms of malignant transformation, tumors progression and antitumor immune response.

АУТОАНТИГЕНЫ И АУТОАНТИТЕЛА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Киямова Р.Г.¹, Костянец О.И.², Гавриш К.В.¹, Филоненко В.В.².

¹ ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина;

Иммунная система является сенсором молекулярных нарушений в опухолевой клетке, а аутоантитела онкологических больных могут быть использованы для идентификации опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА), которые являются потенциальными маркерами злокачественных новообразований человека.

Нами был использован метод SEREX (Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries) для идентификации аутоантигенов рака толстой кишки, рака щитовидной железы и медуллярной карциномы молочной железы. Было идентифицировано 140 положительных рекомбинантных клонов, кодирующих последовательности 81 гена. Характеристика иммунореактивности их белковых продуктов с сыворотками больных разными типами рака позволила выявить среди них несколько потенциальных ОАА. Анализ 12 ОАА, в частности, оценка иммунореактивности с сыворотками пациентов рака молочной железы (РМЖ) (n=112) разных гистологических типов с помощью иммуноферментного анализа, изучение локализации и профиля экспрессии в опухолях молочной железы с учетом их гистологических и молекулярно-биологических особенностей позволил выявить несколько потенциальных диагностических, прогностических и предиктивных маркеров РМЖ.

Среди них особого внимания заслуживает комбинация (сигнатура) 6 аутоантигенов (RAD50, NY-CO-58, PARD3, SAP30BP, SPP1, NY-BR-62), которая позволяет дифференцировать здоровых и больных женщин с чувствительностью 70% и специфичностью 91%. Эта комбинация аутоантигенов представляет собой прототип малоинвазивной тест-системы для диагностики РМЖ у обследуемых женщин. Анализ данных литературы и профиля экспрессии гена *RAD50* в опухолях РМЖ позволил предположить, что он является потенциальным предиктивным маркером эффективности ответа на терапию цисплатином.

Идентифицированные нами аутоантигены могут быть использованы не только для создания на их основе диагностических и терапевтических препаратов, но и для изучения и понимания механизмов злокачественной трансформации, опухолевой прогрессии и противоопухолевого иммунного ответа.

ISOLATION AND INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF ARTIFICIAL MICROVESICLES OF HUMAN TUMOR CELLS

Gomzikova M.O.¹, Zhuravleva M.N.¹, Miftakhova R.R.¹, Arkhipova S.S.¹, Evtugin V.G.¹, Khaiboullina S.F.^{1,2}, Kiyasov A.P.¹, Persson J.L.³, Mongan N.P.^{4,5}, Pestell R.G.⁶, Rizvanov A.A.¹

¹ - Kazan Federal University, Kazan, Russia

² - University of Nevada, Reno, Nevada, USA

³ - Lund University, Lund, Sweden

⁴ - University of Nottingham, UK

⁵ - Weill Cornell Medicine, New York, USA

⁶ - Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA

Extracellular vesicles are membrane vesicles that contain proteins, nucleic acids, lipids and mediate an intercellular communication in human organism [1]. Extracellular vesicles protect bioactive molecules from degradation and deliver its into recipient cells. Extracellular vesicles represent a promising tool for cell-free therapy. However, the amount of extracellular vesicles isolated by routine ultracentrifugation is limited and does not sufficient for a therapeutic use. Pick *et.al.* proposed a method for obtaining an increased amount of microvesicles by treating cells with cytochalasin B [2]. The aim of our work was to obtain the microvesicles from human cells (SH-SY5Y cell line) treated with cytochalasin B.

The tasks of the study was to obtain artificial microvesicles from human cells treated with cytochalasin B, to characterize the size of MV-CB by electron microscopy, to compare the molecular composition of MV-CB SH-SY5Y and parent SH-SY5Y cells for the presence of growth factors, to evaluate the biological activity of MV-CB SY5Y *in vitro* and *in vivo*.

Key words: microvesicles, cytochalasin B, angiogenesis, cell-free therapy.

Results and discussion. Cytochalasin B is a substance that disrupts the cell cytoskeleton structure. Treatment of cells with cytochalasin B or its analogues leads to increase of extracellular vesicles releasing [3-4], since the releasing process of microvesicles requires local destabilization of the actin cytoskeleton [5-6]. The mechanical action (active vortexing) applied to cells promotes the pinch-off of vesicles surrounded by the cytoplasmic membrane and containing the cytoplasmic contents of the parent cell.

We measured the size and characterized the structure and morphology of the MV-CB SH-SY5Y by transmission and scanning electron microscopy (TEM and SEM, respectively). It was established that the MV-CBs are nano- and microvesicles with size ranges from <100 nm to 1800 nm with a peak in the 100-600 nm. The size of MV-CB are similar to natural microvesicles released from the surface of a human cell which have the size 40-2000 nm according to different data [7-8].

We have established that MV-CB obtained from SH-SY5Y cells stimulate human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) for capillary-like structures formation *in vitro* on the extracellular Matrigel matrix. The biological effect of MV-

CB was comparable to SH-SY5Y cells (43.5 ± 3.53 branching of the capillary-like network against 41.33 ± 8.51 branching). In the content of MV-CB growth factors of VEGF and FGF2 were detected.

To assess the proangiogenic activity of MV-CB *in vivo*, subcutaneous injection of MV-CB in Matrigel to laboratory animals *Rattus norvegicus* was performed. It was found that MV-CB SH-SY5Y stimulated sprouting of blood capillaries into the matrix. The density of sprouted blood capillaries per unit area of the histological section was 12.7 times higher than the control sample (subcutaneous injection of Matrigel matrix only) ($p < 0.01$). This indicates an ability of MV-CB SH-SY5Y to stimulate angiogenesis *in vivo*.

Conclusions. The size of MV-CB obtained from SH-SY5Y was from less than 100 nm to 1800 nm with a peak 100-600 nm. MV-CB SH-SY5Y retain biological properties of donor SH-SY5Y cells and are able to stimulate angiogenesis similarly to donor cells *in vitro* and *in vivo*.

The results of our studies indicate that the size of MV-CB is comparable to the size of natural extracellular vesicles. This similarity indicates the promise of MV-CB application as a vector system.

Bibliography

1. S. R. Baglio, K. Rooijers, D. Koppers-Lalic, F. J. Verweij, M. Perez Lanzon, N. Zini, B. Naaijken, F. Perut, H. W. Niessen, N. Baldini and D. M. Pegtel (2015) *Stem Cell Res Ther*;
2. H. Pick, E. L. Schmid, A. P. Tairi, E. Ilegems, R. Hovius and H. Vogel (2005) *J Am Chem Soc*, 127(9), 2908-2912;
3. P. Atanassoff, H. Wolfmeier, R. Schoenauer, A. Hostettler, A. Ring, A. Draeger and E. B. Babiychuk (2014) *PLoS One*, 9(2), e89743;
4. D. S. Choi, J. S. Yang, E. J. Choi, S. C. Jang, S. Park, O. Y. Kim, D. Hwang, K. P. Kim, Y. K. Kim, S. Kim and Y. S. Gho (2012) *J Proteome Res*, 11(2), 1144-1151;
5. O. Morel, L. Jesel, J. M. Freyssinet and F. Toti (2011) *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(1), 15-26;
6. L. C. P. Azevedo (2012) 155-166;
7. E. van der Pol, A. N. Boing, P. Harrison, A. Sturk and R. Nieuwland (2012) *Pharmacol Rev*, 64(3), 676-705;
8. J. C. Akers, D. Gonda, R. Kim, B. S. Carter and C. C. Chen (2013) *J Neurooncol*, 113(1), 1-11.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИСКУССТВЕННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ ИЗ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Гомзикова М.О.¹, Журавлева М.Н.¹, Мифтахова Р.Р.¹, Архипова С.С.¹, Евтюгин В.Г.¹, Хайбуллина С.Ф.^{1,2}, Киясов А.П.¹, Пирссон Дж.Л.³, Монган Н.П.^{4,5}, Пестель Р.Г.⁶, Ризванов А.А.¹

¹ – ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

² – Университет Невады, Рино, США

³ – Лундский университет, Лунд, Швеция

⁴ - Ноттингемский университет, Ноттингем, Великобритания

⁵ - Корнеллский университет, Нью-Йорк, США

⁶ - Университет Томаса Джефферсона, Филадельфия, США

Введение. Внеклеточные везикулы – это мембранные везикулы, которые несут белки, нуклеиновые кислоты, липиды и опосредуют межклеточную коммуникацию в организме человека [1]. Так как внеклеточные везикулы защищают от деградации и доставляют в клетки-реципиенты биоактивные молекулы, они представляют собой перспективный инструмент бесклеточной терапии. Однако количество внеклеточных везикул, получаемых в процессе стандартного ультрацентрифугирования, ограничено и не достаточно для широкого терапевтического применения. Pick *et.al.* был предложен способ увеличения количества получаемых мембранных везикул путем обработки клеток цитохалазином В [2]. Целью нашей работы явилось получение мембранных везикул клеток человека (линия клеток SH-SY5Y) с помощью обработки цитохалазином В и характеристика размера, молекулярного состава и биологической активности полученных микровезикул.

Задачами исследования явилось получение искусственных микровезикул с помощью цитохалазина В (МВ-ЦВ), характеристика размера полученных МВ-ЦВ с помощью электронной микроскопии, сравнение молекулярного состава МВ-ЦВ и клеток-родителей на наличие факторов роста, оценка биологической активности МВ-ЦВ SH-SY5Y *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: микровезикулы, цитохалазин В, ангиогенез, бесклеточная терапия

Результаты и обсуждение. Применение цитохалазина В – вещества, нарушающего структуру цитоскелета, и его аналогов вызывает увеличение количества высвобождаемых внеклеточных везикул [3-4], так как процесс высвобождения микровезикул клеток человека требует локальной дестабилизации актинового цитоскелета [5-6]. Механическое воздействие на клетки в виде активного перемешивания способствует отшнуровыванию везикул, окруженных цитоплазматической мембраной и содержащих цитоплазматическое содержимое клетки.

Мы определяли размер, а также осуществляли характеристику структуры и морфологии полученных МВ-ЦВ SH-SY5Y методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии (ТЭМ и СЭМ, соответственно). Установлено, что фракция МВ-ЦВ содержит нано- и микровезикулы, размер которых составляет от <100 нм до 1800 нм с пиком в области 100-600 нм. При сравнении размера МВ-ЦВ с разными видами естественных внеклеточных везикул, мы пришли к выводу, что по способу образования и размеру получаемые нами МВ-ЦВ сходны с естественными микровезикулами, высвобождаемым от поверхности клетки человека, чей размер составляет 40-2000 нм по разным данным [7-8].

Нами установлено, что МВ-ЦВ, полученные от клеток SH-SY5Y, стимулируют формирование капилляро-подобных структур HUVEC *in vitro* на внеклеточном матриксе Matrigel, подобно клеткам-донорам SH-SY5Y. При этом биологический эффект, оказываемый МВ-ЦВ, оказался сравним с эффектом от клеток SH-SY5Y (43,5±3,53 разветвления капилляро-подобной сети против 41,33±8,51 разветвления). В составе МВ-ЦВ нами были обнаружены факторы роста VEGF и FGF2.

Для оценки проангиогенного действия МВ-ЦВ *in vivo*, осуществляли подкожную инъекцию лабораторным животным *Rattus norvegicus* МВ-ЦВ или клеток SH-SY5Y в матриксе Matrigel. В результате последующего анализа трансплантированного матрикса Matrigel методом флуоресцентной микроскопии, было обнаружено, что МВ-ЦВ SH-SY5Y стимулировали прорастание кровеносных капилляров в толщу матрикса, плотность которых на единицу площади гистологического среза статистически значимо (значение $p < 0,01$) превышала контрольный образец (подкожная инъекция матрикса Matrigel) в 12,7. Это свидетельствует о наличии у МВ-ЦВ SH-SY5Y способности стимулировать ангиогенез *in vivo*.

Выводы. Размер МВ-ЦВ, полученных от SH-SY5Y, составил от менее 100 нм до 1800 нм с пиком в области 100-600 нм.

МВ-ЦВ SH-SY5Y сохраняют свойства клеток-доноров с повышенной ангиогенной активностью и обладают способностью стимулировать ангиогенез подобно клеткам-донорам *in vitro* и *in vivo*.

Заключение. Результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что размер МВ-ЦВ сравним с размером естественных внеклеточных везикул, что свидетельствует в пользу перспективности применения получаемых нами МВ-ЦВ в качестве векторной системы.

Литература:

1. S. R. Baglio, K. Rooijers, D. Koppers-Lalic, F. J. Verweij, M. Perez Lanzon, N. Zini, B. Naaijkens, F. Perut, H. W. Niessen, N. Baldini and D. M. Pegtel (2015) *Stem Cell Res Ther*;
2. H. Pick, E. L. Schmid, A. P. Tairi, E. Ilegems, R. Hovius and H. Vogel (2005) *J Am Chem Soc*, 127(9), 2908-2912;
3. P. Atanassoff, H. Wolfmeier, R. Schoenauer, A. Hostettler, A. Ring, A. Draeger and E. V. Babiychuk (2014) *PLoS One*, 9(2), e89743;

4. D. S. Choi, J. S. Yang, E. J. Choi, S. C. Jang, S. Park, O. Y. Kim, D. Hwang, K. P. Kim, Y. K. Kim, S. Kim and Y. S. Gho (2012) J Proteome Res, 11(2), 1144-1151;
5. O. Morel, L. Jesel, J. M. Freyssinet and F. Toti (2011) Arterioscler Thromb Vasc Biol, 31(1), 15-26;
6. L. C. P. Azevedo (2012) 155-166;
7. E. van der Pol, A. N. Boing, P. Harrison, A. Sturk and R. Nieuwland (2012) Pharmacol Rev, 64(3), 676-705;
8. J. C. Akers, D. Gonda, R. Kim, B. S. Carter and C. C. Chen (2013) J Neurooncol, 113(1), 1-11.

СОСТОЯНИЕ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНОГО ОБМЕНА У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ (НА ПРИМЕРЕ БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ)

Афанасьева З.А.¹, Мухаматгалеева Л.Х.², Билалов Ф.С.³

¹- КГМА - филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава РФ, Казань, Россия,

²-ГБУ «Республиканский онкологический диспансер» Республики Марий Эл,
Йошкар-Ола, Россия

³-ИПО ГБОУ ВПО "Башкирский государственный медицинский университет"
Министерства Здравоохранения РФ, Уфа, Россия

Развитие и прогрессирование злокачественных опухолей зависит не только от биологических свойств опухоли, но и от функционального состояния нейроэндокринной и иммунной систем организма. В ответ на физиологические, психологические факторы и факторы окружающей среды высвобождаются микромолярные концентрации нейротрансмиттеров в окружающие ткани, которые модулируют биологическое поведение новообразований. В литературе отсутствуют сведения о содержании нейротрансмиттеров и их соотношения в плазме крови больных меланомой

Цель: изучить состояние нейротрансмиттерного обмен у онкологических больных (на примере больных меланомой кожи).

Материалы и методы: Исследование нейротрансмиттеров (адреналина, норадреналина, дофамина) и их соотношения (норадреналин-адренолиновый, норадреналин-дофаминовый и дофаминовый коэффициенты) в плазме крови выполнено у 111 больных меланомой кожи и 38 здоровых доноров. Больные были разделены на 3 группы: первичные больные, больные с рецидивом заболевания и больные без рецидива. Для исключения влияния нежелательных факторов (стресса и физических нагрузок) на показатели нейротрансмиттеров забор крови у больных производили через сутки после поступления в стационар утром натощак. Концентрацию адреналина, норадреналина, дофамина в плазме крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с

электрохимической детекцией. Использовали наборы реагентов - 5000 Catecholamines in plasma, Reagent kit for HPLC analysis (Германия)

Результаты и их обсуждение. У больных меланомой кожи в плазме крови наблюдается снижение уровня адреналина по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$ и $p = 0,000$). В группе первичных больных уровень адреналина снижен до $48,36 \pm 4,04$ пг/мл, в группе больных с рецидивом заболевания - до $51,54 \pm 6,82$ пг/мл, в третьей группе больные без рецидива - до $50,3 \pm 4,44$ пг/мл, в группе контроля, составил $77,58 \pm 4,54$ пг/мл. Уровень норадреналина достоверно был снижен в группе первичных больных и составил $284,6 \pm 24,7$ пг/мл, в группе контроля - $409,1 \pm 23,3$ пг/мл ($p < 0,05$). Уровень дофамина в группе первичных больных и больных с рецидивом заболевания был повышен соответственно до $42,98 \pm 1,96$ пг/мл и $47,59 \pm 4,95$ пг/мл по сравнению с группой контроля - $36,84 \pm 2,39$ пг/мл ($p < 0,05$).

Для оценки нейромедиаторного обмена и определения состояния симпато-адреналовой системы большее значение имеет определение соотношения нейротрансмиттеров. Норадреналин-адреналиновый (НА/А) коэффициент в первой группе составил - $7,8 \pm 0,89$, во второй группе - $10,34 \pm 1,51$ и в третьей группе - $8,96 \pm 1,03$, в группе контроля - $5,58 \pm 0,27$ ($p < 0,05$). Норадреналин-дофаминовый (НА/ДА) и дофаминовый (НА+А)/ДА коэффициенты достоверно снижены по сравнению с группой контроля во всех группах меланомой кожи. В первой группе НА/ДА и (НА+А)/ДА составили $6,8 \pm 0,58$ и $7,97 \pm 0,59$ ($p = 0,000$) соответственно, во второй группе - $8,45 \pm 0,77$ и $9,74 \pm 0,82$ ($p < 0,05$), в третьей группе - $8,81 \pm 0,67$ и $10,05 \pm 0,67$ ($p < 0,05$), в группе контроля - $13,8 \pm 1,57$.

С учетом стадии заболевания выявлено достоверно значимое снижение уровня адреналина при I и II стадиях заболевания, уровень норадреналина достоверно снижен при всех стадиях, по уровню дофамина достоверно значимых различий не получено. Коэффициент НА/А повышен при I и III стадиях; коэффициент НА/ДА и (НА+А)/ДА достоверно снижены при I и II стадиях меланомы кожи ($p < 0,05$).

Выводы:

1. Во всех исследуемых группах больных меланомой кожи наблюдается достоверно значимое снижение уровня адреналина, уровень норадреналина достоверно снижен в группе первичных больных, уровень дофамина достоверно повышен в группе первичных больных и с рецидивом заболевания.

2. Повышение норадреналин-адреналинового коэффициента и снижение норадреналин-дофаминового и дофаминового коэффициентов, свидетельствует о достоверной однонаправленности изменений в соотношениях катехоламинов в виде усиления норадренэргического и ослабления адренэргического звена симпато-адреналовой системы и нарушении метаболизма катехоламинов.

3. С учетом стадии заболевания наблюдается фазность в обмене нейротрансмиттеров.

ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА В ГЕНЕЗЕ ПАПИЛЛОМАТОЗА И РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Нигматуллин Л.

ГАУЗ РКОД МЗ РТ, Казань, Россия

Введение. Вопрос роли ВПЧ в развитии рака мочевого пузыря (РМП) в настоящее время остается открытым: результаты некоторых исследований показывают корреляцию инфицирования ВПЧ и развития РМП. Получены данные, согласно которым ДНК ВПЧ-16 нередко присутствует в образцах РМП, причем онкогены вируса Е6 и Е7 во многих из них экспрессируются на уровне мРНК, и в опухолевых клетках синтезируется соответствующий белок.

Цель исследования. Улучшение результатов органосохраняющего лечения папилломатоза и неинвазивного рака мочевого пузыря путем разработки и внедрения научно-обоснованных методологических подходов к противовирусной и фотодинамической терапии

Материалы и методы. В исследование по изучению роли ВПЧ высокоонкогенных типов в рецидивировании папилломатоза и РМП после проведенного стандартного лечения (ТУР, ТУР+ранняя ВПХТ,) были включены 89 пациентов, проходившие лечение с 2014 по 2016 г. в РКОД (Казань) с впервые выявленным папилломатозом, поверхностным РМП, поверхностным рецидивным РМП.

На госпитальном этапе пациенты с выявленным носительством ВПЧ высокоонкогенных типов, после оперативного лечения получали интраоперационную ФДТ с последующей инстилляцией ВПХТ Доксорубицином 50 мгр. С последующей АХТ 8 курсов.

Противовирусная эффективность ФДТ оценивалась на основании диагностического алгоритма, включающего цистоскопию с повторной секстантной биопсией и вирусологическим исследованием

Результаты. Среди изученных нами случаев первичного РМП 74 случая из них ВПЧ положительных оказалось 14 случаев (19%). Среди них женщин 8 (58%), мужчин 6 (42%). В группе ВПЧ положительных пациентов средний возраст составил 50,4 лет (21-82 года), а в группе ВПЧ отрицательных 60,6 лет (48-82 года)

ВПЧ ассоциация преобладала среди пациентов с высокой градацией G2-3 по сравнению с пациентами G1.

С точки зрения значимости фотодинамической терапии ВПЧ представлены следующие аспекты полученных результатов:

Заключение. ФДТ мышечно-неинвазивной формы РМП является важным этапом лечения с воздействием не только на патологический (раковый) эпителий, но и на возможный, причинный фактор канцерогенеза РМП, что позволяет не только излечить пациентов, от РМП, но также провести эрадикацию высокоонкогенных штаммов ВПЧ в уротелии. Что так же способствует полноценной реабилитации пациентов.

CROSS-TALK BETWEEN CANCER CELLS AND IMMUNE CELLS DURING BONE METASTASIS

Persson J.L.

Department of Molecular Biology, Umeå University, Umeå, Sweden. Division of Experimental Cancer Research, Department of Translational Medicine, Lund University, Clinical Research Centre, Malmö, Sweden

Prostate cancer (PCa) and breast cancer preferentially metastasizes to the bone/bone marrow (BM) and causes cancer-related death. Cancer cells spread to the BM by using multiple signals from both cancer cells and cancer-associated immune cells. To study the key molecular signaling that mediates the metastatic invasion of PCa cells into the BM, we developed an ex vivo co-culturing system where we cultured PCa cells together with cells from the BM. We observed that PCa cells gained increased proliferative ability when co-cultured with human monocyte U-937 cells or BM cells from mice. We identified new mechanisms that mediate cross-talk between cancer and immune cells, leading to the progression of cancer metastasis, meanwhile reprogramming the immune cells by cancer cells.

Our study suggests that the altered signals that mediate interactions between PCa and BM cells can be restored by using combination of immuno-therapy and targeted therapy using kinase inhibitor.

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Гарипов К.

ГАУЗ РКОД МЗ РТ, Казань, Россия

Актуальность. По литературным данным, у 25-66% больных дифференцированным раком щитовидной железы (РЩЖ) с отдаленными метастазами развивается частичная или полная резистентность к терапии I-131. С введением в клиническую практику мультикиназных ингибиторов удалось улучшить результаты лечения.

Имеем опыт применения таргетного препарата Сорафениба (Nexavar) зарегистрированного в России в марте 2014 года для лечения у 3 больных радиоiod-резистентным РЩЖ: у 1 мужчины и 2 женщин с папиллярным РЩЖ. Iодрезистентность у пациентов развилась после получения суммарной дозы от 8 до 12,7 ГБк. Всем проводилась супрессивная терапия левотироксином до ТТГ < 0,1 ммоль/л. Пациент 3. мужчина 69 лет, получал Сорафениб 2 недели в дозе

800 мг, далее препарат отменен из-за острого нарушения мозгового кровообращения. Пациентка С. женщина 67 лет, получала Сорафениб с самостоятельной редуцией дозы из-за высокого артериального давления 10 недель: 3 - по 800 мг, 3 – по 600 мг, 4 недели – по 400 мг. Из-за отсутствия эффекта решено вернуться к суточной дозе 800 мг. Пациентка И. женщина, 58 лет, получает сорафениб 13 месяцев. У нее получен хороший клинический эффект с положительной динамикой метастазов в легких.

Вывод. Таким образом, применение Сорафениба позволило получить клинический эффект с уменьшением метастатических очагов в легких у 1 из 2 пациенток с йодрезистентным РЦЖ.

INTERACTION BETWEEN APOPTOSIS AND AUTOPHAGY IN HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA CELLS IN THE CONDITIONS OF METABOLIC STRESS

Topchu J., Abramova Z.I.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Autophagy can act as a tumor suppressor, because during this process, the damaged organelles and protein aggregates are removed to suppress oxidative stress, damage to tissues and genomic instability, which can promote tumor initiation. In contrast, autophagy is enhanced in hypoxic regions to the survival of tumor cells through digestion of cellular contents to generate the required substrates. Activation of apoptosis can be accompanied by an increase in autophagy, which can both limit and contribute to the death of cancer cells.

The aim of this work is to characterize the interaction between two types of programmable cell death (apoptosis and autophagy) of tumor cells (A549 and NCI-H322M) under conditions of metabolic stress. The selected cell lines differ in the status of the gene TP53 (A549 - TP53wt, NCI-H322M - TP53mt). The cells were cultured for 6 days without replacing the nutrient medium, that is, under conditions of metabolic stress. To evaluate programmed cell death, the following methods were used: flow cytometry, electron transmission microscopy and Western blot.

The study shows that the percentage of living cells in 6 days of culture in line A549 higher than the line NCI-H322M. NCI-H322M cells are characterized by a higher percentage of cells in the late apoptosis stage. In cell A549 for 6 days as the depletion of the nutrient medium is blocked apoptosis (increased expression of anti-apoptotic protein), macroautophagy exhibits its activity at 3 and 6 day (expression reduction anti-autophagy signaling kinase mTOR and increased expression of the main markers of protein macroautophagy – LC3B. A decrease of the expression of the heat shock protein 70 suggests that chaperone-mediated autophagy under these conditions does not show its activity. Morphological signs of triggering autophagy in the A549 cell line were also verified.

The cell line NCI-H322M detected no significant decrease of the expression of kinase mTOR, decrease of the expression of the anti-apoptotic of the protein Bcl-2, but no expression LC3B protein.

The results obtained testify to the cytoprotectively role of macroautophagy in the lung adenocarcinoma cells under stress.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ АПОПТОЗОМ И АУТОФАГИЕЙ В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТРЕССА

Топчу Ю., Абрамова З.И.

ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

Аутофагия может выступать в качестве супрессора опухоли, так как в ходе данного процесса происходит удаление поврежденных органелл и белковых агрегатов для подавления окислительного стресса, повреждения тканей и геномной нестабильности, которые могут способствовать инициации опухоли. В противоположность этому аутофагия усиливается в гипоксических регионах для выживания опухолевых клеток за счет переваривания клеточного содержимого с целью генерации необходимых субстратов. Активация апоптоза может сопровождаться усилением аутофагии, что может, как ограничивать, так и способствовать гибели раковых клеток.

Цель настоящей работы – охарактеризовать взаимодействие между двумя видами программируемой клеточной гибели (апоптоз и аутофагия) опухолевых клеток (A549 и NCI-H322M) в условиях метаболического стресса. Выбранные клеточные линии различаются по статусу гена TP53 (A549 - TP53wt, NCI-H322M - TP53mt). Клетки культивировались в течение 6 суток без замены питательной среды, то есть в условиях метаболического стресса. Для оценки программируемой клеточной гибели были использованы следующие методы: проточная цитометрия, электронная трансмиссионная микроскопия и Вестерн-блот.

В ходе исследования было показано, что процент живых клеток к 6 суткам культивирования в линии A549 выше, чем в линии NCI-H322M. Для клеток линии NCI-H322M характерен более высокий процент клеток на стадии позднего апоптоза. В клеточной линии A549 на протяжении 6 суток по мере истощения питательной среды блокируется апоптоз (увеличение экспрессии анти-апоптотического белка), макроаутофагия проявляет свою активность на 3 и 6 сутки (уменьшение экспрессии антиаутофагической сигнальной киназы mTOR и усиление экспрессия основного маркерного белка макроаутофагии – LC3B). Снижение экспрессия белка теплового шока 70 говорит о том, что шаперон-опосредованная аутофагия в данных условиях не проявляет свою активность. Также были верифицированы и морфологические признаки запуска аутофагии в клеточной линии A549.

В клеточной линии NCI-H322M детектируется не значительное снижение экспрессии киназы mTOR, снижение экспрессии антиаутофагического белка Bcl-2, но отсутствие экспрессии белка LC3B.

Полученные результаты свидетельствуют о цитопротекторной роли макроаутофагии в клетках аденокарциномы легкого при стрессе.

NEW OPTIONS OF CANCER DETECTION BY AN EPR/ESR BIOMARKER TEST

Dmitriev P.

MedInnovation GmbH, Berlin, Germany

Background/Objective: Probably all cancer types do alter the albumin conformation (structural and functional modifications) due to accumulation of cancer induced ligands which interfere the binding characteristics of albumin. These changes of albumin conformation flexibility and binding characteristics can be determined by electron paramagnetic resonance (EPR) / electron spin resonance (ESR) spectroscopy. The objective of this study was an analysis of the binding/dissociation function of albumin with the EPR/ESR method using 16-doxyl stearic acid spin probe as reporter molecule and ethanol as modifier of hydrophobic interactions. Changes in albumin were detected, and their utility for screening, diagnosis and therapy monitoring of cancer evaluated.

Material & Methods: The new biomarker test uses electron paramagnetic/electron spin resonance spectroscopy (EPR/ESR) to estimate the functionality of albumin in human serum (EPR/ESR spectrometer XYZ with integrated software MMS (Mobility of Molecular Structure), MedInnovation GmbH, Berlin, Germany). It is based on a comparison of three different serum albumin solutions with increasing concentrations of a spin-labelled fatty acid 16-DOXYL-stearic acid (16-DSA) and ethanol, which simulate binding, transport and release conditions in vitro. For cancer detection an integral discrimination function DR is calculated (DR values <1.0: changed albumin conformation with a high probability of an active malignant process; DR values >1.2: probably no active tumor growth). In case of doubt, additional parameters like binding, transport and detoxification properties are taken into consideration for a more precise result (binding efficiency BE; real transport quality RTQ; detoxification efficiency DTE).

Results: EPR/ESR analysis of serum albumin provides exact and reproducible results. Blood samples (50 μ L of serum) from a population of healthy volunteers (n = 428), patients with a wide variety of malignancies (colon, lung, breast etc. n = 479), and patients with chronic diseases such as gastrointestinal and pulmonary disease, diabetes, and cirrhosis (n = 114). The diagnostic sensitivity and specificity of this test were 92.7% and 94.9%, respectively, for differentiating healthy individuals from cancer patients and 92.5%, and 68.4% for differentiating cancer patients from chronic disease patients.

Cancer detection/Differentiation between healthy individuals and cancer patients: (should be completed and updated)

Cancer therapy and recurrence monitoring of cancer disease: (should be completed and updated)

Early detection of cancer diseases: If the information about cancer processes consists in a changed conformation of albumin, an early detection of different cancer types should be feasible by monitoring look-back samples of blood donors with post-donation report on cancer (LBS-Ca). Analyzed was LBS-Ca, as controls look-back samples of healthy blood donors, and serum samples of healthy blood donors, samples of patients with various types of advanced cancer, samples of patients with non-inflammatory and inflammatory diseases as non-cancer disease controls. The measurements showed that ESR/EPR spectroscopy can detect malignant processes very early. In 111 look-back samples of 63 blood donors with a post-donation report on cancer, malignancies could already be seen 0.1 to 31 months before clinical diagnosis.

Recognition of malignant processes for cancer localization/cancer entity: To recognize different entities of malignant processes from the EPR/ESR spectra, neural nets were implemented. For 48 donors with mamma carcinoma, a specificity of 85% in recognition was achieved. Other entities of carcinoma (22 colon, 18 prostate, 12 stomach) were recognized with specificities between 75% and 84%. Provided, the values of specificity would be found for a larger number of cases, the described ESR method could also be used as new alternative specific tumor marker for early detection of malign processes. Serial evaluation of albumin conformation changes in several patients followed during the course of their disease showed excellent agreement between the magnitude of abnormality in the ESR spectrum of albumin and clinical and pathologic estimates of disease severity.

Conclusion: ESR/EPR spectroscopy of albumin is a new source of diagnostic information resp. a new option of cancer detection. Serum albumin of malignant diseases is altered in its property to change the molecular conformation by blocking physiological dissociation. ESR/ EPR measured changes in fatty acid binding show at albumin bound or accumulated low-molecular-weight molecules. This may reflect malignant processes before biomarker concentrations are reached for conventional laboratory detection. This sensitive and noninvasive technique clearly demonstrates diagnostic utility in patients with cancer. It has the potential for a global and specific tumor marker test to differentiate between healthy and cancer, various carcinoma types, stages, resp. therapy and recurrence monitoring of cancer disease.

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ РАКА С ПОМОЩЬЮ ЭПР ТЕСТА

Дмитриев П.

ЭПР Технологии, Берлин, Германия

Все типы рака изменяют конформацию альбумина (структурные и функциональные изменения) путем накопления индуцированных ими лигандов, что сказывается на характеристиках связывания альбумина. Эти конформационные изменения гибкости и связывающей способности альбумина могут быть выявлены методом Электронной Парамагнитной Резонансной (ЭПР) спектроскопии. Целью данного исследования стал анализ функции связывания/диссоциации альбумина методом ЭПР с использованием 16-доксилстеариновой кислоты, несущей спиновую метку, в качестве сигнал-продуцирующей молекулы, и этанола в качестве модификатора гидрофобных взаимодействий. В ходе эксперимента были выявлены изменения альбумина и дана оценка значимости метода для скрининга, диагностики рака и мониторинга противоопухолевой терапии.

Материалы и методы: Новый биомаркерный тест основан на методе Электронной Парамагнитной Резонансной Спектроскопии и используется для оценки функциональных свойств альбумина в человеческой сыворотке (ЭПР-спектрометр XYZ с интегрированным программным обеспечением MMS (Mobility of Molecular Structure, Мединновейшн ГмбХ, Берлин, Германия). В основе данного метода лежит сравнение трех разных растворов сывороточного альбумина с возрастающей концентрацией спиновой метки.

SELF-FORMATION ANALYSIS OF BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS AND CELLS OF NEUROBLASTOMA IN CO-CULTURE *IN VITRO*

Prudnikov T.S., Kitaeva K.V., Tazetdinova L.G.,
Gomzikova M.O., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V.

Kazan federal university, Kazan, Russia

An actual task in the screening of antitumoral drugs is the creation of a test system that is closely related to a natural tumor, imitating the interaction of cells of the tumor stroma. Protective signaling pathways that appear in the tumor stroma, promote the preservation of residual tumor cells after therapy and lead to a relapse of the disease. For the study of solvation stromal and tumor cells *in vitro* are used various models of extracellular matrix to re-create natural conditions of tissue.

In this work, for the formation a model of the stromal microenvironment were co-cultured SH-SY5Y neuroblastoma tumor cells with mesenchymal stromal cells (MSCs) that have a natural tropism for tumor cells and creation of tumor niches. MSCs retain tumor growth through paracrine signaling of the microenvironment, immunomodulation and differentiation of tumor and stromal compartments.

Materials and methods. The SH-SY5Y and BM-MSC cells isolated by centrifugation in a ficoll density gradient followed by adhesion to the plastic. Before co-cultivation, immunophenotyping of the cell lines was performed on the FACS Aria III instrument (BD Biosciences, USA). It was shown that isolated MSCs express CD markers characteristic of the mesenchymal stem cells. After that, we colored cells of these populations by Vybrant DiD and DiO Cell-Labeling Solution (Thermo Fisher Scientific Inc. USA). They sowed on a 12-well plate with a layer of gelatin of 30,000 cells per well in a 1: 1 ratio. Then we incubated them at 37C and 5% CO₂, recording the changes every 24 hours on a fluorescent microscope AxyObserver.Z1 (Carl Zeiss, Germany). After 9 days of incubation, was performed by flow cytometry.

Results and discussion. On plastic coated with gelatin, the self-organization of the cells resembled channels from MSK and islets from tumor cells. It was noted that some tumor and stoma cells fluoresce simultaneously in several regions of the spectrum, which indicates the fusion of cells. This fact was confirmed by flow cytometry, which showed a high level of exchange of the membrane component of cells containing the vital dye. The described kind of self-organization of stromal and tumor cells can reflect the nature of cell interaction in the tumor stroma where 2 types of cells formed monolayer during metastasis, which was shown by co-cultivation on gelatin and culture plastic. Additional studies have shown that the presence in the co-culture of MSC significantly increased the viability of SH-SY cells under oxidative stress conditions.

АНАЛИЗ САМООРГАНИЗАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ В КО-КУЛЬТУРЕ

Прудников Т.С., Китаева К.В., Тазетдинова Л.Г.,
Гомзикова М.О., Ризванов А.А., Соловьева В.В.

ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

Одной из актуальных задач при скрининге противоопухолевых лекарственных препаратов является разработка тест-системы, наиболее приближенной к натуральной опухоли, моделирующей взаимодействие клеток опухолевой стромы. В настоящей работе для создания модели стромального микроокружения опухолевые клетки нейробластомы SH-SY5Y совместно культивировали с мезенхимными стромальными клетками (МСК), которые имеют естественный тропизм к опухолевым клеткам и формируют опухолевые ниши. МСК поддерживают рост опухоли с помощью паракринной сигнализации микроокружения, иммуномодуляции и коэволюции опухолевых и стромальных компартментов.

В работе использовали МСК, выделенные из костного мозга человека. Иммунофенотип выделенных клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием специфичных антител на приборе FACS Aria III (BD Biosciences, США). Показано, что выделенные МСК экспрессируют CD маркеры, характерные для стволовой мезенхимной клетки: CD44 (95,9% позитивных клеток), CD73 (98,2%), CD166 (79,6%), CD90 (79,2%), CD29 (98,5%), CD105 (88,6%), и не экспрессируют CD маркеры гемопоэтических клеток (CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR). Выделенные клетки обладали способностью к направленной дифференцировке в остео-, хондро- и адипогенном направлениях.

Перед ко-культивированием МСК и SH-SY5Y были окрашены витальными красителями Vybrant DiD и DiO (Thermo Fisher Scientific, США). После окрашивания клетки смешивали в соотношении 1:1 и культивировали в 12-ти луночных планшетах, покрытых 0,1 % желатином при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. Результаты анализировали на инвертированном микроскопе AxyObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения AxyoVision Rel. 4.8.

На пластике, покрытом желатином, самоорганизация клеток напоминала каналы из МСК и островки из опухолевых клеток. Было отмечено, что некоторые опухолевые и стромальные клетки флуоресцировали одновременно в нескольких областях спектра, что свидетельствует о слиянии клеток. Данный факт был подтвержден проточной цитофлуориметрией, которая показала высокий уровень обмена мембранного компонента клеток, содержащего витальный краситель.

Описанный вид самоорганизации стромальных и опухолевых клеток может отражать характер их взаимодействия в строме во время

метастазирования, что и было показано при ко-культивировании на желатине, где МСК выступали в качестве стромы.

Работа финансировалась грантом РФФИ №16-34-60201.

MULTICELLULAR SPHEROID MODEL ON EXTRACELLULAR MATRIX ANALOGUE MATRIGEL

Kitaeva K., Prudnikov T., Tazetdinova L.,
Gomzikova M., Rizvanov A., Solovyeva V.

Kazan federal university, Kazan, Russia

Metastases are the main source of death among cancer patients. Therefore, the study of the processes of metastases formation and the progression of tumors in its natural conditions is relevant for the development of effective methods for the treatment of cancer.

Defensive signaling pathways, which arising in the tumor stroma, contribute to the persistence of residual tumor cells after treatment and relapse. For this in vitro study of tumor and stromal cells we used model of extracellular matrix Matrigel. Cells of neuroblastoma SH-SY5Y co-cultured with mesenchymal stromal cells (MSCs) which have a natural tropism to tumor cells and form a tumor niche, to create a model of stromal microenvironment. MSCs promote tumor growth via paracrine signaling microenvironment, immune modulation and co-evolution of the tumor and stromal compartments. We used MSCs isolated from human bone marrow by centrifugation density gradient in Ficoll. Before entry in the mixed culture MSC and SH-SY5Y were previously painted vital dyes Vybrant DiD and DiO (Thermo Fisher Scientific, USA). After staining, cells were mixed at a ratio of 1:1 and cultured on Matrigel (BD Biosciences, USA). Results were analyzed by fluorescence microscopy on a microscope AxyObserver.Z1 (Carl Zeiss, Germany). After co-cultivation we analyzed cell's population by flow cytometry on FACS Analyser. Despite the fact that cell populations were added to co-culture simultaneously in the form of a single cell suspension, we observed a rapid self-formation of different cell populations. The result of short-term incubation of MSCs and SH-SY5Y for 48 hours on Matrigel was the formation of capillary-like structures, which consisted of SH-SY5Y cells and adjacent MSCs. This indicates a positive tropism to the tumor cells MSCs. However, the received structure was a transition formation, as in 3-4 days MSCs and SH-SY5Y formed a new and unique structure: the spheroid formation in the center of which is located SH-SY5Y, surrounded by MSCs. Such structures can be regarded as a model of the tumor stroma in a tumor progression. It was noted that some tumor and stromal cells is simultaneously fluoresce in several regions of the spectrum, which indicating the cell fusion. This was confirmed by flow cytometry, which showed a high level exchange of membrane component cells which comprising the vital dye. This sort of self-formation of stromal and tumor cells can help to understanding the nature of tumor.

МОДЕЛЬ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ НА АНАЛОГЕ ТРЕХМЕРНОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МАТРИГЕЛЬ

Китаева К., Прудников Т., Тазетдинова Л., Гомзикова М., Ризванов А.,
Соловьева В.

ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

Метастазы являются основной причиной смертности среди онкологических больных. Поэтому исследование процессов формирования метастаз и прогрессии опухоли в ее естественном стромальном окружении представляет интерес для разработки эффективных методов лечения онкологических заболеваний.

Опухолевая строма синтезирует сигнальные молекулы, которые способствуют сохранению остаточных опухолевых клеток после терапии и рецидиву заболевания. Для исследования взаимодействий стромальных и опухолевых клеток *in vitro* используют различные модели внеклеточного матрикса.

Цель работы — исследование самоорганизации мезенхимных стромальных клеток (МСК) и клеток нейробластомы SH-SY5Y при совместном культивировании на трехмерном внеклеточном матриксе Матригель.

МСК были выделены из костного мозга человека методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла с последующей адгезией к пластику. МСК и SH-SY5Y перед внесением в смешанную культуру были предварительно окрашены витальными красителями Vybrant DiD и DiO (Thermo Fisher Scientific, США). После окрашивания клетки смешивали в соотношении 1:1 и культивировали на Матригеле (BD Biosciences, США) при 37 °С во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе FACS Aria III (BD Biosciences, США).

При ко-культивировании, меченые МСК и опухолевые клетки были легко различимы по своему уникальному флуоресцентному излучению. Несмотря на то, что клеточные популяции вносили в ко-культуру одновременно в форме моноклеточной суспензии, мы наблюдали быструю самоорганизацию различных клеточных популяций. Результатом краткосрочной инкубации МСК и SH-SY5Y в течение 48 ч на Матригеле явилось формирование капилляроподобных структур, которые состояли из клеток SH-SY5Y и прилегающим к ним МСК. Это указывает на положительный тропизм МСК к опухолевым клеткам. Однако полученная структура явилась переходной, так как в течение 3–4 дней МСК и SH-SY5Y сформировали новую, уникальную структуру: сфероидные образования, в центре которых располагались SH-SY5Y, окруженные МСК. Подобные структуры могут рассматриваться в качестве модели опухолевой стромы при прогрессии опухоли. Этот вид самоорганизации ко-культуры может отражать характер взаимодействия опухолевых и стромальных клеток во время метастазирования опухоли в

организме. Цитофлуориметрический анализ показал обмен цитоплазмой между стромальными и опухолевыми клетками. Исследования самоорганизации клеток в моделях, имитирующих трехмерные структуры опухолевой ткани, могут повысить эффективность скрининга противоопухолевых препаратов.

Работа финансировалась грантом РФФИ №16-34-60201.

БИОИНЖЕНЕРИЯ 3D ОПУХОЛИ IN VITRO

Рахматуллина А.Р., Мингалеева Р.Н.,
Мифтахова Р.Р., Ризванов А.А.

ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

Исследования последних десятилетий доказывают, что опухоль является гетерогенной структурой, состоящей как из опухолевых, так и стромальных клеток (мезенхимных, эндотелиальных и иммунных). Неопухолевые клетки обеспечивают рост и развитие злокачественного образования путем предоставления внеклеточного матрикса, цитокинов, факторов роста; усиление ангиогенеза также способствует поступлению необходимых питательных веществ и кислорода непосредственно к опухоли. Формирующиеся знания о микроокружении злокачественного образования позволяют подходить к лечению мультимодально и комбинировать различные виды терапии для достижения терапевтической эффективности и повышения качества жизни больных раком.

Культуры клеток в монослое, являющиеся на сегодняшний день классическим методом исследования, не в состоянии воспроизвести точное взаимодействие клеток внутри опухоли. В связи с этим, трехмерные модели заинтересовали ученых, как потенциальные системы для проведения фармакологических тестов в онкологии.

В ходе данной работы создана трехмерная модель опухоли, в основе которой лежат культура мезенхимальных стволовых клеток (МСК; MSC, mesenchymal stem cells) и опухолевые сфероиды - структуры, образованные за счет деления единичных раковых стволовых клеток в специализированной среде.

Цель работы - создание трехмерной гетерогенной *in vitro* модели опухоли для изучения процессов регуляции роста и развития трансформированных клеток.

Работа по ко-культивированию проводилась на клетках карциномы предстательной железы (PC-3) и иммортализованных МСК. Была проведена трансдукция клеток PC-3 геном синего флуоресцентного белка (BFP, blue fluorescent protein) и МСК геном зеленого флуоресцентного белка (GFP, green fluorescent protein). Анализ полученных моноклональных линий PC3-BFP и MSC-GFP включал исследование пролиферативной активности клеток и оценку содержания стволовых опухолевых клеток в популяции. Отобранные в

результате тестов клеточные линии были исследованы в двух- и трехмерных моделях ко-культур.

Был исследован цитокиновый профиль супернатанта моно- и ко-культур клеток PC3-BFP и MSC-GFP. При ко-культивировании клеток наблюдается снижение уровней провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и ИФН-гамма. Наши результаты свидетельствуют, что МСК обладают иммуносупрессивными свойствами и могут способствовать выживанию опухолевых клеток *in vivo*.

BIOENGINEERING 3-DIMENSIONAL MODEL OF TUMOR IN VITRO

Rakhmatullina A.R., Mingaleeva R.N.,
Miftakhova R.R., Rizvanov A.A.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

The tumor is a heterogeneous structure consisting of cancer and stromal (mesenchymal, endothelial, immune and other) cells. Stromal cells provide extracellular matrix, cytokines and growth factors for growth and development of malignant formation. Endothelial cells facilitate the delivery of essential nutrients and oxygen directly to the tumor. The emerging knowledge on tumor microenvironment will allow multimodal approach in combining different types of therapy to achieve better treatment efficacy and improve the quality of life of cancer patients.

Three-dimensional tumor models gain the interest of scientific community, as it is clear that classical monolayer cell cultures cannot reproduce the interaction of cells in a tumor. The aim of the study was to create a three-dimensional heterogeneous *in vitro* tumor model to study the tumor cell growth and development regulation mechanisms.

We have modified tumor sphere formation assay and created a three-dimensional organoids composed of mesenchymal stem cells (MSC) and tumor cells.

Organoid culture experiments were carried out on a blue fluorescent protein (BFP) transduced prostate cancer (PC-3) cells and green fluorescent protein (GFP) transduced immortalized MSCs. Obtained monoclonal PC3-BFP and MSC-GFP cell lines were characterized by sphere formation ability. Further, cell proliferation and cell supernatant cytokine profiling were examined in two- and three-dimensional coculture experiments. We found that levels of some proinflammatory cytokine (IL-6, IL-8 and IFN-g) were significantly reduced then tumor cells were cocultured with mesenchymal cells. These data suggest that MSCs display immunosuppressive features and may promote the tumor cell survival *in vivo*.

MITOCHONDRIAL INHIBITORS DISPLAY BREAST CANCER STEM CELL TARGETING FEATURES IN HYPOXIC ENVIRONMENT

Akhunzyanov A.A., Miftakhova R.R., Rizvanov A.A.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Deregulated cellular metabolism is one of the hallmarks of cancer. Mitochondria play critical role in cellular energetics and metabolism control. Mitochondrial inhibitors have been proposed as potential anticancer compounds. In particular, in 2015 four antibiotics and one antiparasitic agent, which affect mitochondrial metabolism, were shown to target cancer stem cells (CSC) (Lamb, 2015). Taking into account CSCs role in metastases formation we have studied inhibitory effect of antibiotics in hypoxic environment. CSC reside and renew in hypoxic areas, which leads to transcriptional activation of hypoxia inducible factor (HIF) family proteins and further activation of cellular protective mechanisms. Here we show for the first time that antibiotics are able to inhibit MCF-7 cell line derived CSCs under hypoxic condition. In sphere formation assay mammosphere number did not differ under normoxic (20% O₂) and hypoxic (4% O₂) conditions in presence of erythromycin (71,88 % ± 13,5% vs. 63,8% ± 5,00%), doxycycline (68,6% ± 5,0% vs. 52,2% ± 14,6%) and tetracycline (67,4% ± 7,2% vs. 50,0% ± 5,0%). Remarkably, chloramphenicol had better inhibiting activity under hypoxia as compared to normoxia (81,3% ± 3,9% vs. 58,4% ± 1,5%). Azithromycin, on the contrary, did not show inhibiting activity on sphere formation under hypoxic condition. These data indicate that four out of five antibiotics can be potentially applied for eradication of breast CSC, which reside in hypoxic environment.

References:

Lamb R, Ozsvari B, Lisanti CL, Tanowitz HB, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, et al. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget*. 2015;6(7):4569–4584. doi: 10.18632/oncotarget.3174.

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ НА МОДЕЛИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ MCF-7 В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Ахунзянов А.А., Мифртахова Р.Р., Ризванов А.А.

ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

Метаболическое перепрограммирование является необходимым условием выживания и пролиферации опухолевых клеток. Перестройки митохондриального биогенеза, в том числе переход от окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу, играют важную роль в поддержании энергетического баланса и активации анти-апоптотических путей опухолевыми клетками. Относительно недавно было показано, что ингибиторы митохондриального биогенеза обладают противоопухолевой активностью. К примеру, в 2015 году группа исследователей во главе с R. Lamb показали, что антибиотики и противопаразитарные препараты, воздействующие на митохондриальные белки, обладают целевой ингибирующей активностью в отношении популяции стволовых опухолевых клеток (СОК) [Lamb R, *et al.* 2015]. Именно СОК инициируют формирование вторичных метастаз, отвечают за развитие химиотерапевтической резистентности и рецидива заболевания. Важная роль в поддержании популяции СОК отводится опухолевому микроокружению. В частности, условие гипоксии ограничивает дифференцировку СОК и, таким образом, является необходимым для сохранения постоянного пула данных клеток и развития из них метастаз. В связи с этим, целью нашего исследования было изучение влияния ингибиторов митохондриального биогенеза на популяцию СОК в условиях гипоксии. Сферообразование стволовых клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 оценивалось в условиях нормоксии (20% O₂) и гипоксии (4% O₂) в ростовой среде, содержащей один из пяти антибиотиков (азитромицин, доксициклин, тетрациклин, эритромицин, хлорамфеникол). Цитостатический препарат доцетаксел применялся в качестве положительного контроля. Эритромицин, доксициклин и тетрациклин вызвали равнозначное снижение количества маммосфер как в условиях нормоксии, так и в условиях гипоксии (эритромицин - 71,88 % ± 13,5% при нормоксии и 63,8% ± 5,00% при гипоксии; доксициклин - 68,6% ± 4,9% и 52,2% ± 14,6%; тетрациклин - 67,4% ± 7,2% и 50,0% ± 5,0%). Хлорамфеникол показал большую ингибирующую активность в условиях гипоксии в сравнении с нормоксией (81,3% ± 3,9% vs. 58,4% ± 1,5%). Азитромицин, напротив, не влияет на сферообразование при гипоксии, хотя и вызвал снижение количества маммосфер в условиях нормоксии. Приведенные данные свидетельствуют о том, что четыре из пяти антибиотиков могут быть применены для селективной элиминации СОК в составе комплексной терапии опухоли молочной железы.

Литература:

Lamb R, Ozsvari B, Lisanti CL, Tanowitz HB, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F and Lisanti MP. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: Treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget*. 2015.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №16-34-60210 Мол_А_ДК, и субсидий, в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского Федерального Университета.

CHOLESTEROL REPRESENTS AN ENDOGENOUS SONIC HEDGEHOG SIGNALING PATHWAY ACTIVATOR IN MEDULLOBLASTOMA TUMORIGENESIS

Gordon R.E.^{1,2}, Abramova Z.I.¹

1 - Kazan Federal University, Kazan, Russia

2 –Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA

Aberrant activation of Sonic hedgehog (Shh) signaling leads to formation of numerous malignancies, including the most common pediatric brain tumor - medulloblastoma (MB). Despite recent advances in MB treatment, a significant proportion of patients still succumb to this disease. Therefore, improved therapies for MB treatment are urgently needed. Proposed strategies are aimed at blockade of Shh signaling through inhibition of its effector transmembrane protein, Smoothed (Smo). This approach is problematic as the high doses required for tumor regression are toxic and cause developmental disorders and drug resistance.

Cholesterol plays a pivotal role in Shh signaling. We observed an enhanced expression pattern of cholesterol synthesis genes in Shh-driven MB. Here, we demonstrate that tumor cell-derived cholesterol is required for Shh-driven MB tumorigenesis *in vivo*. Additionally, ablation of Shh signaling by cholesterol depletion, both genetically and via cholesterol synthesis inhibitors, results in dramatic inhibition of tumor cell proliferation and allograft growth. Because cholesterol and traditional Smo antagonists interact with distinct sites on the Smo protein, we proposed that altering both mechanisms of Shh pathway activation could synergize to result in further tumor reduction. Excitingly, we found that combination therapy with cholesterol inhibitor simvastatin and a low dose of Smo antagonist vismodegib in an allograft model of MB results in a synergistic effect, decreasing MB tumor burden. This strategy offers a promising new avenue of therapy for this population of pediatric patients and offers further implications for other Shh-dependent malignancies.

ХОЛЕСТЕРИН ЯВЛЯЕТСЯ ЭНДОГЕННЫМ АКТИВАТОРОМ СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА SONIC HEDGEHOG ПРИ МЕДУЛЛОБЛАСТОМЕ

Гордон Р.Э.^{1,2}, Абрамова З.И.¹

¹ - ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

² – Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия, США

Сигнальный путь Sonic Hedgehog (Shh-путь) регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток во ходе эмбрионального развития организма. Патологическое усиление активации Shh-пути приводит к развитию многочисленных онкологических заболеваний человека, в том числе - медуллобластомы (МБ) - наиболее распространенной опухоли головного мозга у детей. Существующие методы лечения МБ блокируют Shh-путь посредством ингибирования его эффектора - трансмембранного белка Smoothed (Smo). Данный подход является проблематичным, так как высокие дозы, необходимые для регрессии опухоли, приводят к развитию серьезных побочных эффектов и резистентности к ингибиторам Smo.

Известно, что холестерин играет ключевую роль в передаче сигнала Shh. Нами было показано, что холестерин, синтезированный клетками МБ, необходим для функционирования Shh-пути. Ингибирование Shh-пути посредством холеsterинового дефицита, как генетически, так и медикаментозно, приводит к резкому снижению пролиферации опухолевых клеток и снижению роста аллотрансплантата. На примере различных клетчных линий было показано, что холестерин оказывает активирующий эффект на Smo. Поскольку холестерин и традиционные антагонисты Smo действуют на различных сайтах белка Smo, мы предположили, что ингибирование обоих участков будет иметь синергетический эффект. Мы обнаружили, что комбинированная терапия ингибитора биосинтеза холестерина симвастатина и антагониста Smo висмодегиба приводит к снижению роста опухоли. Данная стратегия является многообещающим подходом для терапии МБ наряду с другими Shh-опосредованными онкологическими заболеваниями.

BINASE INDUCES APOPTOSIS OF THE TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

Pukhovskaya V., Zelenikhin P.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Breast cancer is the second most common cancer in women, but chemotherapy and targeting antibodies possess certain side effects. Breast cancer is the most common invasive cancer in females worldwide; 18.2 % of all cancer deaths

worldwide, including both males and females, are caused by breast cancer. Today's efforts are aimed to search of new effective methods of breast cancer treatment, especially triple-negative breast cancer, which cannot be affected by conventional therapeutics [1]. Binase, the RNase secreted by *Bacillus pumilus*, possesses unusual biological activities as selective anticancer agent inducing apoptosis in malignant cells [2]. Many aspects of this activity have been elucidated, but the details of its specific mechanisms remain unknown. Here, we found for the first time that the sensitivity of breast cancer cells to binase was not connected with the level of cellular RNA catalytic degradation. Gene expression analysis in different breast cancer cell lines and breast cancer cells from patient samples revealed that the PI3K/AKT pathway activity could be considered as a potential marker of binase effectiveness [3].

The purpose of this investigation was to establish the causes of the unequal sensitivity of breast cancer cells to antitumor RNase.

Using flow cytometry, we estimated capacity of binase and pancreatic RNase A to induce apoptosis of breast cancer cells HBL-100, BT-20, MCF-7, and ZR-75-1. It was shown that ZR-75-1 line possesses maximal sensitivity to binase. The enzyme at concentration 100 µg/ml induced apoptosis of 13 % cells during 24 h of treatment that was twice more that of non-treated cells. After 48 h, the number of apoptotic cells was 18 % of whole population, and at binase concentration 300 µg/ml, this value reached 29 %. The BT-20 cell line has middle sensitivity to binase the MCF-7 line demonstrated significant susceptibility to binase at 300 µg/ml after 24 h, but this effect was eliminated after 48 h. Binase at all concentrations used did not induce apoptosis of HBL-100 cells. Pancreatic RNase A never induced apoptosis in all the cell lines.

We have shown that the four breast cancer cell lines demonstrate different susceptibility to binase cytotoxic action. According to increased level of apoptosis, the cell lines could be aligned from MCF-7 and BT-20 to ZR-75-1. Binase did not affect the HBL-100 line representing triple-negative breast cancer (TNBC), which is defined by the absence of estrogen

and progesterone receptors and the absence of HER2 overexpression. Interestingly, the other TNBC cell line BT-20 carrying PI3K/AKT activation mutation of PIK3CA was sensitive to binase apoptogenic action.

Comparison of gene expression profiles in patients with diagnosed breast cancer and their paired normal tissue, as well as analysis of cancer cells viability in response to binase treatment, allowed us to conclude that PI3K/AKT pathway activity could be considered as a potential marker of binase effectiveness, thus making it one of the hidden reasons of different sensibility of breast cancer cells toward binase.

1. Ravdin P.M. Cronin K.A. Howlander N. (2007) The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States, 356, 1670-4.
2. Ilinskaya O.N. Decker K. Koschinski A. (2001) Toxicology, 156, 101-7.
3. Schlicker A. Michaut M. Rahman R. Wessels L.F. (2016) OncoScape: exploring the cancer aberration landscape by genomic data fusion. Scientific Reports, 6, 28103.

БИНАЗА ИНДУЦИРУЕТ АПОПТОЗ КЛЕТОК ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Пуховская В.С., Зеленихин П.В.

ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

Рак молочной железы – наиболее распространенная форма рака у женщин в мире. На его долю приходится 16% всех злокачественных новообразований и 22.9% инвазивных раковых заболеваний. 18.2% смертей от рака во всем мире, как мужчин, так и женщин, спровоцированы раком молочной железы [1]. В настоящее время цитотоксические рибонуклеазы (РНКазы) микроорганизмов изучаются в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. Главная цель современной медицины – поиск эффективных методов лечения наиболее распространенной формы рака у женщин - рака молочной железы, в особенности трижды негативного, который не может быть затронут обычными терапевтическими средствами. Биназа – РНКазы, секретируемая *Bacillus pumilus*, обладает необычной биологической активностью, как селективный противоопухолевый агент индукции апоптоза в злокачественных клетках [2].

Целью настоящей работы явилось установление причины неодинаковой чувствительности клеток рака молочной железы к противоопухолевой РНКазе. В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Определить апоптоз-индуцирующее действие РНКазы *Bacillus pumilus* (биназы) и панкреатической РНКазы А на клетки карциномы молочной железы человека линий BT-20, HBL-100, ZR-75-1 и MCF-7.

2. Охарактеризовать предположительный молекулярный механизм действия биназы на опухолевые клетки.

3. На основе имеющихся данных подтвердить потенциальную возможность использования биназы в терапии трижды негативного рака молочной железы.

С помощью проточной цитометрии, мы оценили потенциал биназы и панкреатической РНКазы А индуцировать апоптоз клеток рака молочной железы линий HBL-100, BT-20, MCF-7 и ZR-75-1, в которых линии HBL-100 и BT-20 являются трижды негативными раками. Установлено, что максимальной чувствительностью к действию биназы обладает линия ZR-75-1. Линия трижды негативного РМЖ BT-20 показала среднюю чувствительность к биназе. Линия MCF-7 продемонстрировала значительную подверженность к действию биназы в концентрации 300 мкг / мл через 24 ч, однако спустя 48 ч культивирования в присутствии фермента этот эффект не наблюдался. Во всех исследованных концентрациях биназа не индуцировала апоптоз клеток трижды негативного РМЖ HBL-100. Поджелудочная РНКазы А не индуцировала апоптоз ни одной клеточной линии во всем диапазоне исследованных концентраций.

Мы впервые обнаружили, что чувствительность клеток рака молочной железы к биназе не связана с уровнем каталитической деградации клеточной

РНК. Анализ экспрессии генов в различных клеточных линиях рака молочной железы и клетках рака молочной железы из образцов пациентов показали, что РІЗК/АКТ путь можно рассматривать как потенциальный маркер эффективности биназы [3].

Полученные нами результаты подтверждают возможность использования в перспективе биназы и её производных в качестве агентов против трижды негативного рака молочной железы, который, как правило, не реагирует на обычную терапию.

1. Ravdin P.M. Cronin K.A. Howlader N. (2007) The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States, 356, 1670-4.
2. Ilinskaya O.N. Decker K. Koschinski A. (2001) Toxicology, 156, 101-7.
3. Schlicker A. Michaut M. Rahman R. Wessels L.F. (2016) OncoScape: exploring the cancer aberration landscape by genomic data fusion. Scientific Reports, 6, 28103.

INFLUENCE OF 6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE INHIBITION ON SENSITIVITY OF SCC61 LINE TO CISPLATINUM

Minigulova L., Skripova V., Kiyamova R., Serebriisky I.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

One of the problems in cancer therapy is the resistance of tumors to chemotherapy drugs. Therefore, the disclosure of the mechanisms for the development of this stability is an urgent task.

One of the widely used drugs in chemotherapy is cisplatin.

With the help of bioinformatic analysis, we have identified genes that can participate in the regulation of sensitivity to cisplatin. Among them, the 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) gene, the enzyme of the pentose phosphate pathway. It was shown that inhibition of 6PGD by the Phycion inhibitor leads to the death of tumor cells (*R.Lin et al. 2015*).

The aim of the study was to study the effect of inhibition of 6PGD on the sensitivity of tumor cells to cisplatin.

The SCC61 cell line (squamous carcinoma of the head and neck) was used for work. To calculate the concentrations in cisplatin + Phycion combinations, the IC50 values for each substance were determined by a standard procedure. The experiments were performed in triplicate.

The IC50 values for cisplatin and Phycion were $21.19 \pm 4.62 \mu\text{M}$ and $76.4 \pm 17.3 \mu\text{M}$, respectively. Using the combination of cisplatin: Phycion in a ratio of 0.1: 1, the IC50 value for cisplatin decreased to $1.26 \pm 0.37 \mu\text{M}$, and for Phycion it decreased to $53 \pm 15.9 \mu\text{M}$, which indicates a synergistic effect. Analysis of the data in the Calcsyn program confirmed the synergistic effect, the CI (combination index) value was 0.249.

Thus, we have shown that inhibition of 6PGD increases the sensitivity of SCC61 tumor cells to cisplatin. A deeper study of the mechanisms of interaction of these drugs can serve as a basis for the development of new regimens for the treatment of tumor diseases.

1. R. Lin et al. (2015) Nature cell biology, 17(11), 1484-96.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТИРОВАНИЯ 6-ФОСФОГЛЮКОНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛИНИИ SCC61 К ЦИСПЛАТИНУ

Минигулова Л.Ф., Скрипова В.С., Киямова Р.Г., Серебрянский И.Г.

ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

Одной из проблем в терапии рака является устойчивость опухолей к химиопрепаратам. Поэтому раскрытие механизмов развития этой устойчивости является актуальной задачей.

Одним из широко используемых препаратов в химиотерапии является цисплатин.

С помощью биоинформатического анализа мы выявили гены, которые могут участвовать в регуляции чувствительности к цисплатину. Среди них ген 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6PGD), фермента пентозофосфатного пути. Показано, что ингибирование 6PGD с помощью ингибитора Phycion приводит к гибели опухолевых клеток (R.Lin et al. 2015).

Целью работы было изучение влияния ингибирования 6PGD на чувствительность опухолевых клеток к цисплатину.

Для работы использовали линию SCC61 (плоскоклеточная карцинома головы и шеи). Для расчета концентраций в комбинациях цисплатин+Phycion определяли значения IC_{50} для каждого вещества по стандартной методике. Эксперименты проводили в трех повторах.

Значения IC_{50} для цисплатина и Phycion составили $21,19 \pm 4,62$ мкМ и $76,4 \pm 17,3$ мкМ, соответственно. При использовании комбинации цисплатин:Phycion в соотношении 0,1:1 значение IC_{50} для цисплатина снизилось до $1,26 \pm 0,37$ мкМ, а для Phycion до $53 \pm 15,9$ мкМ, что говорит о синергетическом эффекте. Анализ данных в программе Calcsyn подтвердил синергетический эффект, значение CI (combination index) составило 0,249.

Таким образом, мы показали, что ингибирование 6PGD увеличивает чувствительность опухолевых клеток линии SCC61 к цисплатину. Более глубокое изучение механизмов взаимодействия данных препаратов может служить основой для разработки новых схем лечения опухолевых заболеваний.

1. R. Lin et al. (2015) Nature cell biology, 17(11), 1484-96.

INVESTIGATION OF THE CYTOKINE PROFILE OF MESENCHYMAL STEM CELLS PRIMED WITH CISPLATIN AND THEIR ANTITUMOR ACTIVITY IN THE CULTIVATION OF TUMOR CELLS

Tazetdinova L.G.¹, Solovyeva V.V.¹, Gafiyatullin A.S.¹,
Alekseeva E.A., Martynova E.V.¹, Gomzikova M.O.¹, Rizvanov A.A.¹

Kazan Federal University, Kazan, Russia

To maintain growth and progression of the tumor it's necessary to provide constant contact and cross-sharing of various factors and cytokines between tumor cells and other cellular types of tumor microenvironment. [1] Tumor microenvironment is a dynamic environment which consists of different types of cells, such as endothelial cells, fibroblasts, immune cells and mesenchymal stem cells (MSCs). Due to natural tropism to the tumor, MSCs can be used to deliver chemotherapeutic drugs in the metastatic area, premetastatic and tumor niches. [2] One of the effective antitumor drugs is cisplatin, which inhibits the synthesis of DNA, widely used for the therapy of various types of tumors. Inhibition of DNA synthesis leads to a violation of cell division and the initiation of the cell apoptosis. [3] In the present work was investigated cytokine profile and antitumor effect of the conditioned medium (CM) of MSCs from human adipose tissue primed with cisplatin in the culture of tumor cells of neuroblastoma SH-SY5Y in vitro.

MSCs from adipose tissue were isolated by the enzymatic treatment of human adipose tissue with a 0.2% solution of crab collagenase (Biolot, Russia). [4] Isolated cells had a fibroblast-like morphology, had the capacity for prolonged proliferation in vitro (7-8 passages) and the ability for directed differentiation in the chondro-, osteo- and adipogenic directions.

On the FACS Aria III device (BD Biosciences, USA) was determined the immunophenotype of the isolated MSCs by the method of cytofluorimetric analysis using specific antibodies to CD-markers. Isolated MSCs expressed stem cell mesenchymal markers such as CD44 (97.8%), CD73 (99.4%), CD90 (93.4%), CD29 (96.5%), CD166 (86.2%) and doesn't expressed markers of hematopoietic cells (CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR - 0.95%).

To prime MSCs was chosen a non-toxic concentration of cisplatin 5 µg/ml , which was selected using an MTS-test. After incubation with cisplatin, MSCs was trypsinized and washed twice with Hank's solution (Paneco), and then transferred to a new culture flask. [5] After 48 hours of incubation, the CM was collected and applied to SH-SY5Y cells. It has shown that the viability of SH-SY5Y after incubation with CM loaded with MSCs decreased by 20% compared to control cells in a usual culture medium and cells in CM from native MSCs.

Multiplex analysis of CM primed and native MSCs using the Bio-Plex Pro Human Cytokine 21-plex Assay kit (BioRad) was performed on a Luminex 200 device. In CM MSCs primed with cisplatin, the level of the following analytes significantly increased comparently to native cells: IL-2R α , IL-3, IL-16, HGF, MIF,

SCF, SCGF- β and TRAIL. These cytokines are involved in the proliferation and differentiation of various cells, and TRAIL is able to induce apoptosis of tumor cells.

Thereby, has been shown the antitumor activity of MSCs primed with cisplatin for tumor cells SH-SY5Y. The obtained results indicated the prospects of the method for delivery chemotherapeutic drugs using MSCs.

The work was funded by a grant RFBR №16-34-60201.

1. Spaeth E. et al. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. (2008) *Gene Therapy*, 15(10), 730–8.

2. Kidd Sh. et al. Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments using In Vivo. (2009) *Bioluminescence Imaging Stem Cells*. 27(10), 2614–2623.

3. Nils H.N. et al. Mesenchymal stem cells maintain their defining stem cell characteristics after treatment with cisplatin. (2016) *Sci Rep*. 6, 20035.

4. Solovyeva V.V., et al. Genetic modification of adipose derived stem cells with recombinant plasmid DNA pBud-VEGF-FGF2 results in increased of IL-8 and MCP-1 secretion. (2014). *Journal of pure and applied microbiology*. 8(Spl. Edn. 2), 523–8.

5. Gilazieva Z. et al. Effect of Cisplatin on Ultrastructure and Viability of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. (2016) *BioNanoSci*. 6(4), 534–9.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ЗАГРУЖЕННЫХ ПРЕПАРАТОМ ЦИСПЛАТИН, И ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ В КУЛЬТУРЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Тазетдинова Л.Г., Соловьева В.В., Гафиятуллин А.Ш.,
Алексеева Е.А., Мартынова Е.В., Гомзикова М.О., Ризванов А.А.

ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

Для поддержания роста и прогрессии опухоли необходим постоянный контакт и перекрестный обмен различными факторами и цитокинами между опухолевыми клетками и другими клеточными типами опухолевого микроокружения. [1] Опухолевое микроокружение представляет собой динамическую среду, состоящую из различных типов клеток, таких как эндотелиальные клетки, фибробласты, клетки иммунной системы и мезенхимные стволовые клетки (МСК). Благодаря естественному тропизму к опухоли МСК могут быть использованы для доставки химиотерапевтических препаратов в области метастаз, премеаастатические и опухолевые ниши. [2] Одним из эффективных противоопухолевых препаратов является цисплатин, ингибирующий синтез ДНК, широко применяемый для терапии различных видов опухолей. Ингибирование синтеза ДНК приводит к нарушению клеточного деления и запуска апоптоза клетки. [3] В настоящей работе

исследован цитокиновый профиль и противоопухолевое действие кондиционированной среды (КС) МСК из жировой ткани человека, загруженных препаратом цисплатин, в культуре опухолевых клеток нейробластомы SH-SY5Y *in vitro*.

МСК из жировой ткани были выделены с помощью ферментативной обработки жировой ткани человека 0,2% раствором коллагеназы краба (Биолот, Россия). [4] Выделенные клетки имели фибробласто-подобную морфологию, обладали способностью к длительной пролиферации *in vitro* (7–8 пассажей) и способностью к направленной дифференцировке в хондро-, остео- и адипогенном направлениях.

На приборе FACS Aria III (BD Biosciences, США) определяли иммунофенотип выделенных МСК методом цитофлуориметрического анализа с использованием специфичных антител к CD-маркерам. Выделенные МСК экспрессировали маркеры стволовой мезенхимной клетки, такие как CD44 (97,8 %), CD73 (99,4 %), CD90 (93,4 %), CD29 (96,5 %), CD166 (86,2 %) и не экспрессировали маркеры гемопоэтических клеток (CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR – 0,95 %).

Для загрузки МСК была выбрана нетоксическая концентрация цисплатина 5 мкг/мл, которую подбирали с помощью MTS-теста. После инкубации с цисплатином МСК трипсинизировали и дважды промывали раствором Хенкса (Панэко), после чего переносили в новый культуральный флакон. [5] Через 48 часов инкубации собирали КС и наносили ее на клетки SH-SY5Y. Показано, что жизнеспособность SH-SY5Y после инкубации с КС загруженных МСК снизилась на 20 % по сравнению с контрольными клетками в обычной культуральной среде и клетками в КС от нативных МСК.

Был проведен мультиплексный анализ КС загруженных и нативных МСК с использованием набора Bio-Plex Pro Human Cytokine 21-plex Assay (BioRad) на приборе Luminex 200. В КС загруженных цисплатином МСК значительно повышается уровень следующих аналитов по сравнению с нативными клетками: IL-2R α , IL-3, IL-16, HGF, MIF, SCF, SCGF- β и TRAIL. Данные цитокины участвуют в пролиферации и дифференцировке различных клеток, а TRAIL способен вызывать апоптоз опухолевых клеток.

Таким образом, показана противоопухолевая активность МСК, загруженных цисплатином, в отношении опухолевых клеток SH-SY5Y. Полученные результаты указывают на перспективность метода доставки химиотерапевтических препаратов с использованием МСК.

Работа финансировалась грантом РФФИ №16-34-60201.

**MENTAL STRESS IN THE PATHOGENESIS
OF RHEUMATOID ARTHRITIS**

Arleevskaya M.I.¹, Tuaeva N.O.^{1,2}

¹ – Kazan state medical Academy, Kazan, Russia

^{1,2} – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,
Moscow, Russia

Rheumatoid arthritis (RA) is a generally accepted model of autoimmune disease with well known immunological mechanisms of pathogenesis. RA, like most other autoimmune and inflammatory processes, is a multifactorial disease. 30-60% of its risk is due to the genetic predisposition, and 40-70% – to the influence of environmental factors. A psychological (mental) stress is known to be one of the major factors of the civilization burden. There are strong evidences of clustering of depressive symptoms in patients with RA and the mood, stress and social influence on disease severity. We aimed to study whether psychological stress and depression might trigger RA and to elucidate the mechanisms of this triggering impact on the prone to RA individuals. When comparing the pathogenetic mechanisms of stress and rheumatoid arthritis, it turned out that these mechanisms largely coincide. As a result of studying the literary and our own data the following conclusions were formulated:

1. The adequate stress reaction on the challenges leads to the increased secretion of corticotropin-releasing hormone (CRH) and glucocorticoids. The later interact with the immune cell glucocorticoid receptors (GR), that being due to the proinflammatory response and inhibition of adrenocorticotropin (ACTH) and GR as a feedback mechanism, resulting in normal emotional state, and adaptation.

2. The prolonged/chronic stress or depression is due to the increased glucocorticoid and CRH secretion, and to the epigenetic modifications of the GR and glucocorticoid resistance. Insufficient activation of GR leads to the activity of proinflammatory transcription factors, proinflammatory cytokine production and subsequent somatization, or worsening pathology.

3. In the case of RA, CRH and glucocorticoid secretion is reduced, as well as the expression of GR, that being due to the transcription of the proinflammatory genes and enhanced inflammatory response on the various environmental challenges.

4. At the same time in RA there is the activity of the Central AWG and glucocorticoid production are reduced. That might be due to the defect of the pituitary-pituitary-adrenal (HPA) axis and RA triggering by stress. The genetic and epigenetic studies of the decreased HPA-axis activity and the features of the response to acute and/or chronic stress in patients with RA and susceptible persons are needed.

МЕНТАЛЬНЫЙ СТРЕСС В ПАТОГЕНЕЗЕ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Арлеевская М.И.¹, Туаева Н.О.^{1,2}

¹ – КГМА - филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава РФ, Казань, Россия

² – ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва,
Россия

Ревматоидный артрит (РА) является общепризнанной моделью аутоиммунных заболеваний с хорошо известными иммунологическими механизмами патогенеза. Это заболевание, как и большинство других аутоиммунных и воспалительных процессов, имеет многофакторную природу. 30-60% риска его развития обусловлено генетической предрасположенностью, 40-70% связано с влиянием факторов окружающей среды. Одним из важнейших факторов цивилизационной нагрузки на организм человека является психологический (ментальный) стресс. Имеются веские доказательства кластеризации депрессивных симптомов у больных РА, влияние настроения, стрессоустойчивости и социальной поддержки на тяжесть заболевания. Но могут ли спровоцировать РА психологический стресс и депрессия? И каков механизм трансформации эмоционального состояния в аутоиммунное заболевание? Если обратиться к неплохо изученным механизмам развития стресса и депрессии, обращают на себя внимание общие звенья патогенеза РА и стресса. Однако есть и различия. Изучению возможных взаимосвязей различных видов ментального стресса и РА посвящена данная работа. В результате изучения литературы и собственных изысканий, сформулированы следующие тезисы:

1. При адекватной работе стрессовой системы, стрессовый фактор вызывает усиление секреции кортикотропин-релизинг гормона (КРГ) и глюкокортикоидов. Последние связываются с глюкокортикоидными рецепторами (ГР) иммунокомпетентных клеток. Связывание ГР с лигандом приводит к трансрепрессии генов провоспалительного ответа, сдвиг ответа Th1 к Th2 и ингибирование адренкортикотропина (АКТГ) и КРГ по механизму обратной связи, в результате чего нормализуется эмоциональное состояние, и происходит адаптация.

2. При длительном, хроническом стрессе или депрессии происходит усиление секреции КРГ и глюкокортикоидов, но в результате эпигенетических модификаций ГР развивается глюкокортикоидная резистентность. Недостаточная активация ГР приводит к активности провоспалительных транскрипционных факторов, которые, в свою очередь, трансактивируют гены провоспалительных цитокинов и последующую соматизацию, либо усугубление патологии.

3. В случае РА секреция КРГ и глюкокортикоидов снижена, так же как и экспрессия ГР, что ведет к активации транскрипционных факторов и усиленному воспалительному ответу на инфекции.

4. Очевидно, что при схожести процессов, происходящих при РА и ментальном стрессе, имеются и различия. Основное из них – низкий статус центрального КРГ и глюкокортикоидов при РА. Возможно, этот дефект гипофизарно-питуитарно-надпочечниковой (ГПА) оси приводит к манифестации РА после стресса. Причину скорее всего следует искать в генетических особенностях и эпигенетических модификациях ГПА-оси. Для решения этой задачи необходимо дальнейшее углубленное изучение: а) снижения статуса ГПА-оси и б) особенности ответа на острый и/или хронический стресс у больных РА и предрасположенных лиц.

THE NUCLEOLUS HYPOTHESIS OF AUTOIMMUNE DISEASES: DISRUPTION OF EPIGENETIC CONTROL DURING CELLULAR STRESS

Brooks W.

University of South Florida, Tampa, USA

The nucleolus is one of the most dynamic and active components of a cell. The main function of the nucleolus is to assemble specific RNA transcripts and proteins into ribonucleoprotein complexes such as ribosomal subunits, splicing components, transfer RNAs, and signal recognition particles. Any misfolded or misassembled complexes must be resolved to avoid non-functional complexes. Persistence of abnormal complexes could present abnormal conformational epitopes that are potentially autoantigenic. Such abnormal complexes may invoke an autoimmune reaction when exposed extracellularly. Many autoantigens, such as those seen in systemic lupus erythematosus, are at least transiently components of the nucleolus. For example, the Ro and La proteins that assist in processing of RNA polymerase III transcripts in the nucleolus, could be constant epitopes in a variety of complexes with abnormally folded RNA transcripts.

The nucleolus can change dramatically in size, particularly during episodes of cellular stress when nucleolar ribonucleoprotein products are in demand to help resolve the stress. The nucleolus does not contain significant amounts of DNA but dramatic nucleolar expansion during a stress response could lead to engulfment and disruption of nearby chromatin. Particularly interesting is the inactive X chromosome (Barr body) which is typically located at the nuclear membrane and is often observed in close association with nucleoli. This places the Barr body in a vulnerable position trapped between the membrane and nucleolus. Disruption of the Barr body could lead to expression from previously silent alleles and elements, such as Alu elements, LINE1 reverse transcriptases and genes involved in polyamine synthesis and recycling. Increases in polyamines are closely associated with the increase in nucleolar size and polyamines are critical for ribonucleoprotein folding and assembly since, as polycations, the polyamines can counter the intra-strand self-repulsion of RNA molecules. Polyamines can also stabilize alternate conformations, such as Z-DNA, which is often an autoantigenic target in lupus.

The “nucleolus” hypothesis of autoimmune diseases will be discussed with details on its occurrence and consequences.

Keywords: Barr body, Nucleolus, Polyamines, Epigenetics, RNA polymerase.

EPIGENOME AND SJÖGREN'S SYNDROME

Renaudineau Y.

Brest University Medical School, Brest, France

Sjögren's syndrome (SS) is a systemic autoimmune epithelitis with a major female incidence, and characterized by a dry syndrome, impaired quality of life, visceral involvement, and lymphoma for the most aggressive cases. During this process, epithelial cells acquire the capacity to produce cytokines, chemokines, and autoantigens which can in turn be presented to the immune system. Consequently, this epithelitis is accompanied by lymphocytic infiltrations leading to the formation of pseudo-follicles in which self-reactive B lymphocytes are present. The recent integration of genomic and especially of epigenomic data, which make it possible to analyze the different cellular partners, open new perspectives and allow to a better understanding of this complex and still incurable disease.

SHAPING THE SPECTRUM – FROM AUTOINFLAMMATION TO AUTOIMMUNITY

Hedrich C.M.

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, TU Dresden, Dresden, Germany

Autoimmune-inflammatory disorders historically have been categorized into autoinflammatory vs. autoimmune diseases. More than a decade ago, an immunological continuum was proposed, placing "classical" autoinflammatory disorders at the one end and autoimmune disorders at the other end.

More recently, shared pathomechanisms and tight interconnections between innate and adaptive immune mechanisms have been appreciated. An overview of recent developments and observations will be provided, filling in some of the gaps and discussing strong interconnections between innate and adaptive immune mechanisms during inflammatory responses. The focus will be put on three exemplary disorders: i) the autoinflammatory disorder systemic juvenile idiopathic arthritis (sJIA); ii) the mixed-pattern disorders chronic nonbacterial osteomyelitis (CNO) and psoriasis; and iii) systemic lupus erythematosus, a prototypical autoimmune disease.

Scientific observations suggest that individualized treatment targeting innate or adaptive immune mechanisms in disorders from either end of the immunological spectrum may control disease activity will be summarized and discussed.

INTESTINAL DYSBIOTIC TRANSGLUTAMINASES ARE POTENTIAL ENVIRONMENTAL DRIVERS OF SYSTEMIC AUTOIMMUNOGENESIS

Lerner A.^{1,2}, Aminov R.³, Matthias T.²

¹ B. Rappaport School of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

² AESKU.KIPP Institute, Wendelsheim, Germany

³ School of Medicine & Dentistry, University of Aberdeen, Aberdeen, United Kingdom

Protein-glutamine γ -glutamyltransferases (transglutaminases) belong to the class of transferases. They catalyze the formation of an isopeptide bond between the acyl group at the end of the side chain of protein- or peptide-bound glutamine residues and the first order ϵ -amine groups of protein- or peptide-bound lysine. The transglutaminases are considered to be universal protein cross-linkers, and they play an essential role in cellular functions as well as in a number of human diseases. Currently, mainly the bacterial transglutaminases in terms of the functionality of the enzymes and a potential role they may play in bacterial survival is discussed. It should be mention that the processed food industries add microbial transglutaminase (mTg) as a food additive to improve the texture, test and shelf time of numerous products. Since mTgs are functionally similar to the human homologs, mainly to the endogenous tissue transglutaminase (the auto antigen of celiac disease), they may be involved in the human disease provocation. Most recently, we have observed specific antibodies against the cross linked complex of mTg with gliadin in celiac patients' sera. A potential involvement of luminal dysbiotic originated transglutaminases in the pathologies such as autoimmune diseases is suggested. In this hypothesis, the endogenous mTgs that are secreted by the gut microbiota, especially in a dysbiotic configuration, are potential drivers of systemic autoimmunity, via the enzymatic posttranslational modification of peptides in the gut lumen. These mTg activities directed towards cross-linking of naïve proteins can potentially generate neo-epitopes that are not only immunogenic but may also activate some immune response cascades leading to the induction, maintenance and/or progression of pathological autoimmune diseases.

1. Lerner A, Matthias T. Possible association between celiac disease and bacterial transglutaminase in food processing: a hypothesis. *Nutr Rev.* 2015;73:544-552.

2. Lerner A, Jermias P, Matthias T. The world incidence of celiac disease is increasing: a review. *Internat. J. Of Recent Scient. Res.* 2015;7:5491-5496.

3. Lerner A., Aminov R., Matthias T. Dysbiosis may trigger autoimmune diseases via inappropriate posttranslational modification of host proteins. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:Article 84

4. Matthias T., Jeremias P, Neidhöfer S, Lerner A. The industrial food additive microbial transglutaminase, mimics the tissue transglutaminase and is immunogenic in celiac disease patients. *Autoimmun Rev*, 2016; 15:1111-1119.

5. Lerner A., Aminov R., Matthias T. Intestinal dysbiotic transglutaminases are potential environmental drivers of systemic autoimmunogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 2017;8;article 66.

INTERACTION OF GRANULOCYTES WITH ENDOTHELIAL CELLS IN CONDITIONS OF HYPOXIA

Safronova V.G.¹, Tikhonova I.V.¹, Serov D.A.¹, Filina Yu.V.^{1,2},
Astashov M.E.¹, Kosyakova N.I.³, Chemeris N.K.¹

¹ – Federal State-financed Organization of Science the Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

² – Kazan Federal University, Kazan, Russia

³ – Hospital of Pushchino Research Center, Pushchino, Russia

Introduction. Circulating blood cells, endothelium and smooth muscle cells participate in regulation of blood flow in microvessels. Many endogenous factors, receptors and signaling pathways provide fine control of vasoconstriction and vasodilatation [1]. Blood leukocytes produce certain vasoactive agents (eicosanoids, growth factors, oxygen metabolites) which modulate both vascular tone and functional state of the blood cells by a feedback mechanism. The agents provide local regulation of blood microcirculation in norm and pathologies. The interaction of the vascular endothelium with neutrophils, the most mobile immune cells, is a critical stage of their recruiting to the site of infection and inflammation [2]. Relationship of endothelial cells and neutrophils in pathologies associated with hypoxia remains to be studied. Our work was aimed to study the adhesion interaction of granulocytes and endothelial cells in patients with bronchial asthma (BA) and in a model of chronic hypoxia in mice.

Methods. Granulocytes were isolated from human peripheral blood or bone marrow of BALB/c strain mouse. Prime cultures of endothelial cells isolated from human umbilical vein (Human Umbilical Vein Endothelial Cells - HUVEC) or mouse microvessels were used. Patients with BA, living in conditions of chronic hypoxia, and healthy volunteers were examined at the Hospital of the Pushchino Research Center. Each individual gave written informed consent to participate in the study. The mice were kept in a controlled atmosphere at CO₂ content (1%) for 3 weeks and anesthetized before an isolation of the cells. Adhesion test was carried out using spectrophotometric analysis [3]. The ability of granulocytes to produce reactive oxygen species (ROS) was estimated by a chemiluminescence technique.

Results and discussion. Patients with atopic bronchial asthma out of exacerbation (n=60) were examined. The diagnosis was verified by GINA-2012/2016. Healthy individuals were recruited as controls (n=46). The characteristics of external respiration in BA patients did not differ versus the controls. The dynamic characteristics of cellular chemiluminescent response to opsonized particles were significantly higher in the whole blood of BA patients, which indicates an increased reactivity of their phagocytes compared with the controls. Isolated granulocytes of BA patients showed significantly enhanced adhesion to HUVEC. But agonists of formylpeptide receptor (bacterial peptide formyl-MLF and synthetic peptide WKYMVM) did not influence adhesion, whereas the adhesion of healthy donor cells was significantly enhanced.

Preliminary data on the effect of experimental hypoxia on the adhesion of granulocytes on the microvascular endothelial cells and their ability to produce ROS were obtained. It was revealed tendency to increased adhesion and decreased ROS production in mouse cells after hypoxic conditions. Peptide N-formyl-MLF decreased adhesion of the cells in the control and experimental groups.

Summary. Granulocytes of BA patients out of the exacerbation demonstrated the increased reactivity to generate ROS in response to microbial fragments and in adhesion to endothelial cells. The receptor for bacterial peptides is poorly involved in both processes.

Conclusion. The increased adhesiveness of cells, accompanied by high reactivity in the generation of ROS, is a risk factor in BA patients out of exacerbation.

Key words: endothelium, granulocyte, adhesion, hypoxia

The work was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 16-15-00248.

References

1. Watts S.W. Kanagy N.L. Lombard J.H. (2011) Receptor-Mediated Events in the Microcirculation. *Comprehensive Physiology* P. 285-348. DOI:10.1002/cphy.cp020407.
2. Langereis J.D. (2013) Neutrophil integrin affinity regulation in adhesion, migration, and bacterial clearance. *Cell Adh. Migr.* 7(6), 476-481.
3. Safronova V.G. Vulfius C.A. Sheluhina I.V. et al. (2016) Nicotinic receptor involvement in regulation of functions of mouse neutrophils from inflammatory site. *Immunobiology.* 221, 761-772.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГРАНУЛОЦИТОВ С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Сафронова В.Г.¹, Тихонова И.В.¹,
Серов Д.А.¹, Филина Ю.В.^{1,2}, Асташев М.Е.¹,
Косякова Н.И.³, Чемерис Н.К.¹

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия

2 – ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

3 – Больница Пущинского научного центра РАН, Пущино, Россия

Введение. Циркулирующие клетки крови, эндотелий и гладкомышечные клетки участвуют в регуляции кровотока в микрососудах. Множество эндогенно продуцируемых факторов, их рецепторов и сигнальных путей обеспечивают тонкое управление вазоконстрикцией и вазодилатацией [1]. Определенные вазоактивные агенты (эйкозаноиды, ростовые факторы, метаболиты кислорода) продуцируются лейкоцитами крови и модулируют как тонус сосудов, так и функциональное состояние клеток крови по механизму обратной связи. В микроциркуляторном русле их роль состоит главным образом в локальной регуляции кровотока в норме и при патологиях. Взаимодействие нейтрофильных гранулоцитов (нейтрофилов), наиболее мобильных клеток врожденного иммунитета, с эндотелием сосудов является критической стадией их привлечения в очаг инфицирования и воспаления [2]. Реципрокные отношения эндотелиальных клеток и нейтрофилов при патологиях, сопряженных с гипоксией, остаются мало изученными. Цель настоящей работы состояла в исследовании адгезионного взаимодействия гранулоцитов с эндотелиальными клетками у больных бронхиальной астмой (БА) и в модели хронической гипоксии у мышей.

Методы. Гранулоциты были изолированы из периферической крови человека и костного мозга мышей линии BALB/c. Пациенты с бронхиальной астмой, живущие в условиях хронической гипоксии, и здоровые добровольцы были обследованы в Больнице Пущинского научного центра РАН, они дали письменное информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом по этике. В работе использованы первичные культуры эндотелиальных клеток микрососудов мышцы и пупочной вены человека (Human Umbilical Vein Endothelial Cells – HUVEC). Мыши находились в контролируемой атмосфере по содержанию CO₂ (1%) в течение 3-х недель, перед выделением клеток животные были анестезированы ингаляционно-инъекционным методом с помощью закиси азота и золетила (50 мг/кг). Адгезионный тест проведен с помощью спектрофотометрического анализа [3]. Способность гранулоцитов продуцировать активные формы кислорода (АФК) оценена в хемилюминесцентной пробе.

Результаты и обсуждение. 1. Обследовано 60 пациентов с atopической БА вне обострения, диагноз верифицирован по GINA-2012/2016. Контрольную

группу составили 46 условно здоровых добровольцев. Показатели хемилюминесцентного ответа клеток в нефракционированной крови на опсонизированные частицы были значительно выше у больных БА, что свидетельствует о повышенной реактивности их фагоцитов по сравнению с контролем. Гранулоциты больных БА показали значительно усиленные адгезионные свойства при взаимодействии с HUVEC. Но агонисты рецепторов формилпептидов FPR (бактериальный пептид формил-MLF и синтетический пептид WKYMVM) не влияли на их адгезию, тогда как адгезия клеток здоровых доноров значительно усиливалась. 2. Получены предварительные данные по влиянию экспериментальной гипоксии на адгезию гранулоцитов из костного мозга мыши и их способность продуцировать АФК. Адгезионный тест показал понижение адгезии и усиление генерации АФК клетками мышей в ответ на формилпептид после гипоксических условий. Наблюдалась тенденция к усилению адгезии под действием формил-MLF у мышей контрольной и экспериментальной групп.

Выводы. Вне обострения гранулоциты больных БА проявляют повышенную реактивность в генерации АФК в ответ на микробные фрагменты и в адгезионном взаимодействии с клетками эндотелия. Рецептор бактериальных пептидов слабо вовлечен в оба процесса.

Заключение. Повышенная адгезивность клеток, сопровождаемая высокой реактивностью в генерации АФК, является фактором риска у больных БА вне обострения.

Ключевые слова: эндотелий, гранулоцит, адгезия, гипоксия

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант №16-15-00248.

Литература

1. Watts S.W. Kanagy N.L. Lombard J.H. (2011) Receptor-Mediated Events in the Microcirculation. *Comprehensive Physiology* P. 285-348. DOI:10.1002/cphy.cp020407.
2. Langereis J.D. (2013) Neutrophil integrin affinity regulation in adhesion, migration, and bacterial clearance. *Cell Adh. Migr.* 7(6), 476-481.
3. Safronova V.G. Vulfius C.A. Sheluhina I.V. et al. (2016) Nicotinic receptor involvement in regulation of functions of mouse neutrophils from inflammatory site. *Immunobiology.* 221, 761-772.

OXIDATIVE AND NON-OXIDATIVE MECHANISMS UNDERLYING MACROPHAGE PHAGOCYtic FUNCTION

Riazanski V., Nelson D.J.

Department of Pharmacological and Physiological Sciences, The University of
Chicago, USA

Phagocytic cells of the innate immune system engulf and destroy bacteria during a sequence of oxidative and non-oxidative biochemical reactions taking place in a maturing phagosome. In a short period of time, phagosomal ionic content undergoes rapid changes in order to supply necessary elements for enzymatic and chemical reactions, as well as to provide an electrochemical gradient to aid an electrogenic pump function. During the oxidative burst, reactive oxygen species (ROS): superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, and hypochlorous acid are elevated in a phagosome to levels lethal to bacteria. The ability to reach critical conditions to ensure bacterial lethality can vary, depending on the amount of phagosomal H^+ , Cl^- , Fe^{2+} and reactive forms of oxygen. Oxidation of Fe^{2+} is critical during the Fenton reaction to generate highly reactive hydroxyl radical and hydroxide ions. A slower process of acidification in phagosomes has been shown to have a key role in the microbicidal function of phagocytes since the optimum range for proteolytic enzyme function lies in the acidic pH. Low intraphagosomal pH is driven by the vesicular proton-ATPases (v-ATPases), proton pumps that use cytoplasmic ATP to load protons into the organelle. Chloride channels have been implicated in the pH regulation of several intracellular organelles including lysosomes and phagosomes, presumably through the provision of counter ions to electrically neutralize luminal H^+ accumulation, which allows further acidification of a phagosome followed by bacterial eradication. We have shown a clear dependence of intraphagosomal pH on the presence of a functional chloride channel, CFTR. Recently, using the fluorescent Cl^- probe 10,10'-Bis[3-carboxypropyl]-9,9'-acridiniumdinitrate (BAC), we obtained data indicating differential Cl^- kinetics in phagosomes from WT and CFTR-deficient AMs. In addition to CFTR, Ca^{2+} -permeable ion channels are involved in the acidification of phagosomes. We have shown that TRPC6 channels can provide a pathway for the efflux of Ca^{2+} from phagosome into cytoplasm which is critical for intracellular signaling. An efflux of an abundant cellular cation such as K^+ can provide an alternative to Cl^- mechanism contributing to intraphagosomal acidification in the course of phagocytosis. Our data show that macrophages utilize both Oxidative and non-oxidativemechanisms to destroy engulfed bacteria and the rate of phagosomal acidification is dependent on the ionic fluxes.

REGULATION OF P53-DEPENDENT GENES EXPRESSION IN MULTIPLE SCLEROSIS THROUGH ACTIVATION OF P53.

Valiullina A.Kh.¹, Khaibullin T.I.², Gomzikova M.O.¹,
Rizvanov A.A.¹, Bulatov E.R.¹

¹Kazan Federal University, Kazan, Russia

²Republican Clinical Neurological Center, Kazan, Russia

Transcription factor p53 is a well-studied multifunctional tumor suppressor. It is involved in the induction of apoptosis, stimulation of DNA repair processes, cell cycle control and regulation of basic metabolism. Recent examples in this field of study suggest the involvement of p53 and its negative regulator MDM2 in autoimmune processes. Nutlin-3a is a small molecule inhibitor of p53-MDM2 interaction that displaces p53 from its complex with MDM2, and leads to p53 activation. Therefore the use of such class of inhibitors can be considered as a promising therapeutic approach to the treatment of autoimmune diseases, for example multiple sclerosis (MS). In the present study we demonstrated concentration-dependent Nutlin-3a-induced expression of *p21*, *MDM2* and *PUMA* in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of an MS patient and a healthy donor. The results showed that a gradual increase in Nutlin-3a concentration leads to higher expression levels of these p53-dependent genes in MS patient samples compared to healthy donor samples. Overall, the obtained data may indicate an elevated transcriptional function of p53 protein in MS.

The study was funded by RFBR research grant 16-34-60213 mol_a_dk.

Keywords: Multiple sclerosis, gene expression, *p53*, *p21*, *MDM2*, Nutlin-3a.

References

1. Bulatov E, Khaiboullina S, Reis dos HJ, Palotás A, Venkataraman K, Vijayalakshmi M, Rizvanov A. Ubiquitin-Proteasome System: Promising Therapeutic Targets in Autoimmune and Neurodegenerative Diseases. *BioNanoSci.* 2016 Aug 11;6(4):341–4.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ P53- ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ ПУТЕМ АКТИВАЦИИ БЕЛКА P53 ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

Валиуллина А.Х.¹, Хайбуллин Т.И.², Гомзикова М.О.,
Ризванов А.А.¹, Булатов Э.Р.¹

¹ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

²Республиканский клинико-неврологический центр, Казань, Россия

Белок p53 играет важную роль в различных клеточных процессах, таких как индукция апоптоза, стимуляция репарации ДНК, регуляция основного метаболизма, остановка клеточного цикла. Однако, в настоящее время в

литературе появляется значительное количество работ, указывающих на участие белка p53 в процессах, связанных с механизмами функционирования иммунной системы, а также аутоиммунитетом. Таким образом, можно предположить потенциальную значимость функций белка p53 при аутоиммунных заболеваниях, к примеру, при рассеянном склерозе (РС).

Ключевые слова: *Рассеянный склероз, экспрессия гена, p53, p21, MDM2, Nutlin-3a.*

В представленной работе для активации p53 и определения изменения экспрессии p53-зависимых генов использовался Nutlin-3a – высоко-селективный ингибитор убиквитин лигазы MDM2, негативного регулятора p53. Эксперименты проводились с использованием мононуклеарных клеток периферической крови как здорового донора, так и больного РС.

Инкубирование клеток с Nutlin-3a на протяжении 24 часов приводило к зависимому от концентрации повышению экспрессии p53-зависимых генов, в частности *p21, MDM2, PUMA*. Однако, при этом в клетках больного РС наблюдалось значительно более выраженное повышение экспрессии данных генов.

Полученные данные могут свидетельствовать о повышенной транскрипционной функции белка p53 у больных рассеянным склерозом.

Публикации:

Bulatov E, Khaiboullina S, Reis dos HJ, Palotás A, Venkataraman K, Vijayalakshmi M, Rizvanov A. Ubiquitin-Proteasome System: Promising Therapeutic Targets in Autoimmune and Neurodegenerative Diseases. *BioNanoSci.* 2016 Aug 11;6(4):341–4.

CHANGES IN THE MONOCYTE MEMBRANE INDUCED BY PLATELET FACTOR 4-CONTAINING IMMUNE COMPLEXES

Andrianova I.A.¹, Rauova L.^{2,3}, Litvinov R. I.^{1,2}

¹Kazan Federal University, Kazan Russia

²University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA

³The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, USA

Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is an iatrogenic antibody-mediated disorder with a high propensity for thrombosis. It has been shown that HIT-like monoclonal antibodies (mAb) named KKO bind with platelet factor 4 (PF4) and with glycosaminoglycans (GAGs) on the surface of platelets and monocytes, initiating cell activation. The aim of this work was to investigate the influence of HIT-like immune complexes on the monocyte membrane.

Isolated monocytes were incubated with pathogenic HIT-like monoclonal antibodies KKO, PF4 or with immune complex KKO/PF4. We used scanning electron microscopy, confocal microscopy, and flow cytometry to characterize the

morphology and function of isolated human monocytes and mouse transgenic Fcγ receptor IIa positive (FcγRIIA+) or wide type (FcγRIIA-) monocytes.

Addition of recombinant human PF4 initiated the activation process with the appearance of "knobs" on the surface of monocytes. Subsequent addition of the HIT-like monoclonal antibody KKO altered dramatically the cellular surface with the appearance of large membrane "blebs" that were not seen on FcγRIIA-negative mouse monocytes. These large, membrane-associated structures likely engage FcγRIIA receptors, clustering them in proximity to cell-bound immune complexes, which promotes cell activation that leads to thrombosis. These blebs increase in size over time and are then shed from the cells as monocyte-derived microparticles, which self-aggregate. As a result of shedding of these blebs, the monocytes lose much of their typical ruffled surface and appear smoother, sometimes with pores indicating degranulation. Addition of the non-pathogenic mAbs not only did not induce blebbing, but largely inhibited PF4-induced changes in the monocyte surface. Flow cytometry confirmed that the shed particles contain cell membrane lipids and receptors. Confocal microscopy showed uniform binding of labeled PF4 to the monocyte cell membrane followed by rapid clustering into large complexes after the addition of KKO.

These studies affirm the centrality of cell surface PF4/GAG complexes in the pathogenesis of HIT and provide quantitative morphometric characteristics of the changes in the monocyte membrane structure. We propose that PF4 released from activated platelets binds to the surface of GAG-expressing monocytes in vivo, forming clusters of PF4/GAG complexes that likely promote antibody binding and cause monocyte activation through FcγRIIA along with large-scale remodeling of the cell membrane and shedding of procoagulant microparticles.

ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАНЫ МОНОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ФАКТОР 4

Андрианова И.А.¹, Рауова Л.^{2,3}, Литвинов Р.И.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

² Медицинский факультет Пенсильванского университета, Филадельфия, США

³ Детская больница Филадельфии, Филадельфия, США

Цель: Гепарин-индуцированная тромбоцитопения (ГИТ) – аутоиммунное осложнение гепаринотерапии с высоким риском тромбоза. Антитела, образующиеся у больных ГИТ, как и ГИТ-подобные моноклональные антитела, связываются с тромбоцитарным фактором 4 (ТФ4) и гликозаминогликанами на поверхности тромбоцитов и моноцитов, вызывая активацию клеток. Целью работы было изучение структурных изменений мембраны моноцитов под действием иммунных комплексов, имитирующих реакции ГИТ in vitro.

Методы: Изолированные моноциты, инкубированные с патогенными моноклональными ГИТ-подобными антителами, ТФ4 или их комплексами, изучались методами сканирующей электронной микроскопии, конфокальной микроскопии и проточной цитометрии. Исследовали моноциты человека и мышей, экспрессирующих или не экспрессирующих рецептор FcγRIIA, опосредующий взаимодействие клеток с антителами у людей.

Результаты: При инкубации моноцитов с рекомбинантным ТФ4 человека (100 мкг/мл) наблюдались признаки активации клеток с появлением округлых выпячиваний мембраны размером 177 ± 53 нм, занимающих ~70% поверхности моноцитов. Последующее добавление ГИТ-подобных моноклональных антител (50 мкг/мл) приводило к образованию мембранных «пузырей» размером 701 ± 208 нм, которые отсутствовали на мышинных моноцитах без рецептора FcγRIIA. Эти пузыри с течением времени увеличивались в размере, а затем отделялись от клетки, образуя микровезикулы, часть которых агрегировала. В результате отделения микровезикул моноциты утрачивали свойственную им неровную поверхность и становились более гладкими, иногда с порами, которые указывают на дегрануляцию. Инкубация моноцитов с непатогенными моноклональными антителами не сопровождалась образованием пузырей и даже ингибировала изменения мембраны моноцитов, индуцированные ТФ4. Проточная цитометрия подтвердила, что микровезикулы содержат фосфолипиды и белки плазматической мембраны моноцитов. Конфокальная флуоресцентная микроскопия показала равномерное связывание меченого ТФ4 с плазматической мембраной моноцитов с последующей кластеризацией, вызванной добавлением ГИТ-подобных антител.

Выводы: Патогенные антитела к ТФ4 и гепарину инициируют реорганизацию клеточной мембраны моноцитов, экспрессирующих рецептор FcγRIIA. Результаты подтверждают центральную роль иммунных комплексов, содержащих ТФ4 и гликозаминогликаны, в патогенезе ГИТ. Предполагаемый механизм: ТФ4 из активированных тромбоцитов взаимодействует с гликозаминогликанами на поверхности моноцитов, образуя комплексы, которые связывают антитела, активирующие моноцит через FcγRIIA с ремоделированием плазматической мембраны и образованием прокоагулянтных микровезикул.

PLATELET ACTIVATION AND APOPTOSIS INDUCED BY THE IMMUNE COMPLEX IgG/PLATELET FACTOR 4 AS THE PATHOGENIC MECHANISMS IN HEPARIN-INDUCED THROMBOCYTOPENIA

Nevzorova T.A.¹, Mordakhanova E.R.¹, Ponomareva A.A.^{1,2}, Andrianova I.A.¹,
Litvinov R.I.^{1,3}

¹Kazan Federal University, Kazan, Russia

²Kazan Institute of biochemistry and biophysics, Russian Academy of Sciences,
Kazan, Russia

³University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA

Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is a complication of heparin therapy, which is characterized by thrombosis with a decrease in platelet counts. The main pathogenetic mechanism of HIT is production of antibodies (Abs) against complexes formed by platelet factor 4 (PF4) and heparin. Triple immune complexes Ab/heparin/PF4 interact with platelets through Fc-receptors, which can potentially cause both activation and apoptosis of the cells. We investigated effects of Ab/PF4 pathogenic immune complexes on the isolated platelets by flow cytometry and scanning electron microscopy. Platelets were isolated from the blood of healthy subjects by gel filtration and were incubated with a complex containing recombinant PF4 and a pathogenic anti-PF4/heparin mouse monoclonal antibody KKO. It was found that the KKO/PF4 complex caused a significant increase of P-selectin expression on platelets and formation of microparticles, which indicates activation of platelets. This activating effect of KKO/PF4 was similar to that induced by Ca²⁺ ionophore A23187 (positive control). In addition, KKO/PF4 increased phosphatidylserine expression on the platelet surface with a reduction of the mitochondrial membrane potential, which is characteristic of cell apoptosis. The pro-apoptotic effects of the KKO/PF4 complexes were accompanied by morphological changes in platelets: the loss of discoid shape, a decrease in size, formation of filopodia, and release of microparticles. Formation of intracellular vacuoles and enlargement of the lumen of the open canalicular system in KKO/PF4-treated platelets were also observed. These results collectively indicate that the pathogenic KKO/PF4 complex cause both platelet activation and apoptosis, which can be important mechanisms of thrombocytopenia complicating treatment with heparin.

АКТИВАЦИЯ И АПОПТОЗ ТРОМБОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИММУННОГО КОМПЛЕКСА IgG/ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ФАКТОР 4 КАК ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕПАРИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИИ

Невзорова Т.А.¹, Мордаханова Э.Р.¹, Пономарева А.А.^{1,2}, Андрианова И.А.¹,
Литвинов Р.И.^{1,3}

¹ - ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

² - Институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН,
Казань, Россия

³ - Медицинский факультет Пенсильванского университета,
Филадельфия, США

Гепарин-индуцированная тромбоцитопения (ГИТ) - осложнение гепаринотерапии, которое характеризуется микро- и макротромбозом на фоне снижения числа тромбоцитов в периферической крови. Патогенетической основой ГИТ является выработка антител (АТ) против комплексов, образованных тромбоцитарным фактором 4 (ТФ4) и гепарином. Иммуные комплексы АТ/гепарин/ТФ4 взаимодействуют с тромбоцитами через Fc-рецепторы, что может теоретически вызывать не только активацию, но и апоптоз клеток. Чтобы проверить это предположение, мы исследовали влияние патогенных иммунных комплексов АТ/ТФ4 на функциональное состояние изолированных тромбоцитов методами проточной цитометрии и сканирующей электронной микроскопии. Тромбоциты, выделенные из крови здоровых доноров гель-фильтрацией, инкубировали в течение 15 мин и 60 мин в присутствии преформированного комплекса, образованного рекомбинантным ТФ4 (10 мкг/мл) и патогенным мышинным моноклональным антителом ККО (50 мкг/мл), которое на экспериментальных моделях *in vivo* вызывает ГИТ. Обнаружено, что комплекс ККО/ТФ4 через 15 мин инкубации вызывал достоверное увеличение экспрессии Р-селектина на мембране тромбоцитов и образование микровезикул, что свидетельствует об активации тромбоцитов на начальном этапе взаимодействия патогенного иммунного комплекса с клетками. Этот эффект был аналогичен действию на тромбоциты кальциевого ионофора А23187 (положительный контроль). Кроме того, под действием ККО/ТФ4 увеличивалась экспрессия фосфатидилсерина на мембране и уменьшался митохондриальный потенциал тромбоцитов. Эти показатели достоверно изменялись по сравнению с контролем к 60 мин инкубации, что свидетельствует о зависимой от времени индукции апоптоза тромбоцитов под действием комплекса ККО/ТФ4. Описанные про-апоптотические эффекты комплекса ККО/ТФ4 дополняются морфологическими изменениями тромбоцитов: клетки теряют дисковидную форму, уменьшаются в размере, формируют псевдоподии и микровезикулы; наблюдается расширение открытой канальцевой системы и формирование множества внутриклеточных вакуолей. Результаты в совокупности указывают на то, что патогенный комплекс

ККО/ТФ4 вызывает как активацию, так и апоптоз тромбоцитов, который может быть одной из причин тромбоцитопении при лечении гепарином.

KINETICS AND NANOMECHANICS OF SINGLE-MOLECULE INTERACTIONS OF DNA WITH A MONOCLONAL ANTI-DNA ANTIBODY THAT INDUCES SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Nevzorova T.A.¹, Lomakin Y.A.², Zhao Q.K.³,
Purohit P.K.³, Litvinov R. I.^{1,4}

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ University of Pennsylvania School of Engineering and Applied Science, Philadelphia,
USA

⁴ University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, USA

DNA-containing immune complexes contribute to the development of autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE). The pathogenetic potential of antibodies to DNA depends on their structure and properties, but the differences between pathogenic and non-pathogenic antibodies are not fully understood. In this work, we studied the rupture forces of a bimolecular complex of a monoclonal antibody to DNA (MRL4), which was obtained from a SLE mouse, with DNA molecules using laser tweezers, or the optical trap. The DNA-antibody immune complex was formed by touching a microscopic bead coated with covalently immobilized antibody molecules with a surface covered with DNA molecules. The spherical bead with antibodies was trapped by a focused laser beam, which allowed manipulating this particle, repeatedly brought into contact with a DNA-coated surface and the rupture forces from this surface were measured, which reflected the binding strength of the antibody and DNA. A histogram of the rupture forces of the DNA-antibody complex indicated the presence of two regimes that corresponded to intermediate (20-40 pN) and stronger (> 40 pN) binding interactions, indicating the presence of at least two states with different binding affinities. The average rate constant for the dissociation of the DNA-antibody complex $\sim 2.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, the transition state distance $\sim 0.94 \text{ nm}$, the apparent on-rate constant of the complex formation $\sim 5.26 \text{ s}^{-1}$, the spring constant 0.0021 pN/nm indicate the mechanical stability and at the same time elasticity of the immune complex. The stretching elasticity of the DNA molecules corresponded to single-stranded DNA, therefore, the monoclonal antibody MRL4 interacts with the DNA preferentially via single-stranded DNA-regions. The quantitative characteristics of the formation and dissociation of the DNA-antibody immune complexes allow one to understand the principles of the interaction of DNA with proteins, including those involved in the pathogenesis of autoimmune diseases.

КИНЕТИКА И НАНОМЕХАНИКА ЕДИНИЧНЫХ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДНК С МОНОКЛОНАЛЬНЫМ АНТИ-ДНК-АНТИТЕЛОМ, ВЫЗЫВАЮЩИМ СИСТЕМНУЮ КРАСНУЮ ВОЛЧАНКУ

Невзорова Т.А.¹, Ломакин Я.А.², Zhao Q.K.³,
Purohit P.K.³, Литвинов Р.И.^{1,4}

¹ - ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

² - Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

³ - Факультет инженерных и прикладных наук Пенсильванского университета,
Филадельфия, США

⁴ - Медицинский факультет Пенсильванского университета, Филадельфия, США

ДНК-содержащие иммунные комплексы вносят вклад в развитие аутоиммунных заболеваний, например, системной красной волчанки (СКВ). Патогенетический потенциал антител к ДНК зависит от их структуры и свойств, но отличия патогенных от непатогенных антител не ясны. В данной работе, используя лазерный пинцет, или «оптическую ловушку», мы изучали силу разрыва бимолекулярного комплекса моноклонального антитела к ДНК MRL4 (полученного на основе мышинной модели СКВ) с молекулами ДНК. Иммунный комплекс ДНК-антитело формировался в результате касания микроскопической «бусинки», покрытой ковалентно иммобилизованными молекулами антитела, с поверхностью, покрытой молекулами ДНК. Сферическая «бусинка» с антителами была захвачена фокусированным лазерным лучом, который позволял манипулировать этой частицей, многократно приводить ее в соприкосновение с поверхностью, покрытой ДНК, и измерять силу отрыва от этой поверхности, которая эквивалентна прочности связывания антитела и ДНК. Неоднородность сил разрыва комплекса ДНК-антитело свидетельствует о наличии двух режимов, которые соответствуют слабым (20-40 пН) и более прочным (>40 пН) взаимодействиям, что указывает на наличие, как минимум, двух типов комплексов с разной аффинностью. Усредненные константа скорости диссоциации комплекса ДНК-антитело $\sim 2.2 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, длина переходного состояния $\sim 0.94 \text{ нм}$, кажущаяся константа скорости образования комплекса $\sim 5.26 \text{ с}^{-1}$, пружинящая константа 0.0021 пН/нм свидетельствуют о механической стабильности и в то же время эластичности иммунного комплекса. Параметры упругости растягиваемой молекулы ДНК соответствуют одноцепочечной ДНК, следовательно, моноклональное антитело MRL4 взаимодействует с ДНК предпочтительно по одноцепочечным участкам. Количественные показатели формирования и диссоциации иммунного комплекса ДНК-антитело позволяют понять принципы взаимодействия ДНК с белками, в том числе участвующих в патогенезе аутоиммунных процессов.

CHANGES IN THE CYTOKINE PROFILE AFTER GENE-CELL THERAPY IN TRAUMATIC DISEASE OF SPINAL CORD

Akhmetzyanova E.R., Mukhamedshina Y.O.,
Martynova E.V., Galieva L.R., Zhuravleva M.N.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Currently there is no adequate therapeutic approaches for the full restoration of lost functions over patients with traumatic spinal cord injury (SCI). Existing methods do not solve the main cause of neurodegeneration- neurons and glial cells death. Inflammation and tissue infiltration of various immune cells, which can penetrate into the tissue of the spinal cord in violation of the blood-brain barrier, plays a significant role in the pathogenesis of secondary injury. At the site of inflammation immune reaction that provides additional negative effect on the outcome of the injury is arise. In addition, inflammatory processes lead to a systemic reaction that can cause autoimmune dysfunction that closely resemble those of multiple sclerosis and central nervous system lesions in systemic lupus erythematosus. The question of a greater role for the positive or negative impact of the immune processes on the regeneration is still a matter of discussion.

The most complete evaluation of immunological reactions in SCI, affecting the course of post-traumatic processes are not carried out, although it may potentially have prognostic value and help the physician in choosing the optimal treatment strategy. Since inflammatory and autoimmune reactions from the standpoint of aggravating degeneration processes and neuroregeneration inhibition lead to various negative results, it is extremely urgent an expanded multiplex analysis of cytokine profile in order to identify possible ways to modulate these posttraumatic reactions. In our work, we investigated cytokine profile in serum and spinal cord tissues from experimental animals dosed contusion SCI model, including genetic background of spent cell therapy (microglial cells carrying glial-derived neurotrophic factor gene - *gdnf*).

Our investigation demonstrates that inflammatory reaction and immunological response are not limited within CNS after SCI, but widespread. This fact confirmed by detecting a change of cytokine profile in blood serum samples. It seems important further study a complex cytokine network imbalance after SCI and determining their possible correlation with the severity of the damage and clinical events, that will allow a better understanding of the role of the cytokine profile in the pathophysiology of the disease.

ИЗМЕНЕНИЯ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ НА ФОНЕ ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СПИННОГО МОЗГА

Ахметзянова Э.Р., Мухамедшина Я.О.,
Мартынова Е.В., Галиева Л.Р., Журавлева М.Н.

ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

На сегодняшний день нет адекватных терапевтических подходов для полного восстановления утраченных функций пациентов с травматическим повреждением спинного мозга (ТСМ). Существующие методы не решают главную причину нейродегенерации - гибель нейронов и глиальных клеток. Значительную роль в патогенезе вторичного повреждения играют воспалительные процессы и инфильтрация ткани различными иммунными клетками, которые могут проникать в ткань спинного мозга при нарушении гематоэнцефалического барьера. В месте воспаления возникают иммунные реакции, которые оказывают дополнительный негативный эффект на исход повреждения. Кроме того, воспалительные процессы приводят к системной реакции, которая способна вызвать аутоиммунные дисфункции, которые близко напоминают такие при рассеянном склерозе и поражении ЦНС при системной красной волчанке. При этом вопрос о большей роли позитивного или отрицательного влияния иммунных процессов на регенерацию до сих пор вызывает дискуссии.

Наиболее полная оценка иммунологических реакций при ТСМ, влияющих на течение посттравматических процессов, не проведена, хотя потенциально может иметь прогностическое значение и помочь врачу в выборе оптимальной стратегии терапии. Поскольку воспалительные и аутоиммунные реакции с позиций усугубления процессов дегенерации и торможения нейрорегенерации приводят к различным отрицательным результатам, представляется исключительно актуальным проведение расширенного мультиплексного анализа цитокинового профиля с целью определения путей возможной модуляции указанных посттравматических реакций. В рамках нашей работы мы исследовали цитокиновый профиль в сыворотке и ткани спинного мозга экспериментальных животных с моделью дозированной контузионной ТСМ, в том числе на фоне проводимой генно-клеточной терапии (клетки микроглии, несущие ген глиального нейротрофического фактора - *gdnf*).

Наше исследование показало, что воспалительные реакции и иммунологический ответ не лимитирован ЦНС. Это факт подтверждается обнаруженными изменениями цитокинового профиля в сыворотке крови. Представляется важным проведение дальнейших исследований цитокинового дисбаланса после ТСМ и обнаружение его возможной корреляции с тяжестью повреждения и клиническими проявлениями, что позволит лучше понять роль цитокинового профиля в патофизиологии болезни.

FIBER STRUCTURE AND LYTIC RESISTANCE OF FIBRIN IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Nabiullina R.M.^{1,2}, Shakurova M.A.¹, Maksudova A.N.²,
Zubairova L.D.², Litvinov R.I.^{1,3}

¹Kazan Federal University, Kazan Russia
²Kazan State Medical University, Kazan, Russia
³University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

Thrombosis develops in more than 10% of patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Formation and lysis of clots in the blood of patients with SLE studied by dynamic turbidimetry were characterized by deceleration of the polymerization kinetics, an increase in the maximum optical density of clots and increased susceptibility to fibrinolysis. Scanning electron microscopy showed that the fibrin network in SLE consisted of thicker fibers than fibrin formed in the blood plasma of healthy people. The results obtained suggest that fibrin clots in the blood of SLE patients have altered structure and properties that may contribute to the course and outcomes of thrombotic complications in SLE.

СТРУКТУРА ВОЛОКОН И ЛИТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ФИБРИНА ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

Набиуллина Р.М.^{1,2}, Шакурова М.А.¹, Максудова А.Н.^{1,2},
Зубаирова Л.Д.², Литвинов Р.И.^{1,3}

¹ ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия
² ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Россия
³ Пенсильванский университет, Филадельфия, США

Тромбозы развиваются более чем у 10% больных системной красной волчанкой (СКВ). Формирование и лизис сгустков в плазме крови больных СКВ, изученные методом динамической турбидиметрии, характеризовались замедлением кинетики полимеризации, повышением максимальной оптической плотности сгустков и повышенной устойчивостью к фибринолизу. Сканирующая электронная микроскопия показала, что фибриновая сеть при СКВ состоит из более толстых волокон, чем сгустки в плазме крови здоровых людей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что сгустки фибрина больных СКВ обладают протромботическими свойствами.

ACTIVATED MONOCYTES ENHANCE CONTRACTION OF BLOOD CLOTS: A LINK BETWEEN INFLAMMATION AND BLOOD COAGULATION

Peshkova A.D.¹, Minh G.L.¹, Andrianova I.A.¹, Litvinov R.I.^{1,2}

¹Kazan Federal University, Kazan Russia

²University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA

Recent studies have reported that leukocytes play an important role in hemostasis as both pro- and anticoagulants. However, the cellular and molecular mechanism of this relationship has not been fully understood. Here we investigated effects of activated monocytes on the contraction of blood clot, a process that can modulate the ability of thrombi to obstruct the lumen of blood vessels at the sites of inflammation.

The work was carried out in accordance with the permission of the Ethical Committee of ICDC (Kazan). The kinetics of contraction of blood clots was followed using a Thrombodynamics Analyser System (HemaCore, Moscow, Russia). Formation and contraction of blood clots were initiated by addition of thrombin and CaCl₂. Isolated monocytes were activated with phorbol-myristate acetate (PMA). The activated monocytes were added to whole blood in an amount equal to the initial number of endogenous monocytes. When activated monocytes were added to the blood, an increase in the average degree of contraction was observed in comparison with non-activated monocytes. It is known that activated monocytes are capable of expressing a tissue factor that could be a source of additional thrombin generation. To test this hypothesis, monocytes before activation were incubated with an inhibitor of tissue factor expression (PPAR α). The absence of a tissue factor on the surface of activated monocytes under the action of an inhibitor was confirmed by flow cytometry assays using fluorescently labeled antibodies to the tissue factor. After incubation with the inhibitor, the effect of monocytes on contraction was suppressed. In conclusion, increased contraction of blood clots under the action of activated monocytes might present a new mechanistic link between inflammation and hemostasis or thrombosis.

АКТИВИРОВАННЫЕ МОНОЦИТЫ УСИЛИВАЮТ КОНТРАКЦИЮ СГУСТКОВ: СВЯЗЬ ВОСПАЛЕНИЯ И СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Пешкова А.Д.¹, Жанг Л.М.¹, Андрианова И.А.¹, Литвинов Р.И.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

²Медицинский факультет Пенсильванского университета, Филадельфия, США

Исследования последних лет показали, что воспалительные клетки, например, нейтрофилы, моноциты и макрофаги выполняют важную роль в системе гемостаза как про- или антикоагулянты. Однако механизмы этих эффектов во многом не понятны. В данной работе изучено влияние активированных моноцитов на контракцию, т.е. спонтанное сжатие, кровяного сгустка, что может модулировать способность тромбов обтурировать просвет кровеносных сосудов в очагах воспаления.

Для изучения контракции кровяного сгустка был использован оригинальный метод оптической регистрации изменений объема сгустка. Работа с кровью проводилась в соответствии с разрешением Этической комиссии МКДЦ (Казань). Образование сгустка крови и его контракцию индуцировали добавлением хлорида кальция и тромбина человека. Динамику контракции оценивали с помощью прибора «Регистратор тромбодинамики» («ГемаКор», Москва). Моноциты были выделены из крови 44 здоровых доноров центрифугированием на Фиколле и негативной иммунопреципитацией. Полученные моноциты были активированы форбол-миристат-ацетатом, который был удален из препарата центрифугированием. Активированные моноциты были добавлены в цельную кровь в количестве, равном числу эндогенных моноцитов. При добавлении активированных моноцитов к крови наблюдалось увеличение средней степени контракции ($47,8 \pm 2,0\%$) по сравнению с неактивированными моноцитами ($43,5 \pm 0,3\%$, $p < 0,05$). Известно, что активированные моноциты способны экспрессировать тканевый фактор, который мог быть источником дополнительного тромбина. Чтобы проверить это предположение, моноциты перед активацией были инкубированы с ингибитором экспрессии тканевого фактора (PPAR α). Отсутствие тканевого фактора на поверхности активированных моноцитов под действием ингибитора подтверждали с помощью проточной цитометрии с использованием флюоресцентно меченых антител к тканевому фактору, т.е. anti-CD-142 антител. После инкубации с ингибитором эффект моноцитов на контракцию был подавлен: средняя степень контракции составила $43,1 \pm 0,4\%$ и не отличалась от контроля с неактивированными моноцитами. Таким образом, усиленная контракция сгустков крови и тромбов под действием активированных моноцитов может представлять собой новый механизм взаимодействия между воспалением и реакциями гемостаза/тромбоза.

ANALYSIS OF SERUM CYTOKINES AND CHEMOKINES LEVELS OF MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS AFTER THE ADMINISTRATION OF XEMYS

Okunola O.D., Aleksandrova N.M.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune neurodegenerative disease that affects the central nervous system (CNS). MS develops when proliferation of autoreactive immune cells that cross the blood brain barrier (BBB) into the CNS leads to chronic inflammation and subsequently, the destruction of myelin sheath of nerve cells [1].

Almost all chronic and inflammatory diseases and pathologies, including multiple sclerosis, are connected to infringement of cytokine regulation. Therefore, cytokine levels clearly play a crucial role in the development of multiple sclerosis [2].

Belogurov A. et al [3, 4] previously reported the efficiency of immunodominant peptides of myelin basic protein (MBP), encapsulated in mannosylated liposomes (Xemys) in the suppression of experimental allergic encephalomyelitis (EAE). This therapeutic composition was created in parallel with a variety of techniques to induce tolerance towards MBP, the major antigen in MS.

The aim of our research was to characterize the changes in cytokine levels and the Th1/Th2 ratio after the administration of Xemys.

A total of 18 MS patients were subcutaneously administered with a total of 2.675mg of encapsulated MBP peptides, with an increasing dosage over 6 weeks. The patients were followed up for 18 weeks. We analyzed the cytokine levels in the serum sample of the patients collected before, and after the administration of Xemys (6-18 weeks). In total, we analyzed levels of 17 cytokines

We found that cytokine levels returned to normal levels of healthy subjects after Xemys treatment in MS patients, especially for IL-2, IL-7, CCL2, CCL4, and TNF- α . However, the levels of IFN- γ were unchanged and significantly higher than healthy subjects. It has been shown that treatment with IFN- β reduces the secretion of IFN- γ and inhibits various IFN- γ -related reactions [5]. Therefore, a therapy using Xemys, in combination with an anti-IFN- γ composition can be more effective.

Список литературы

1. Nylander and D.A. Hafler. Multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 4, pp. 1180–1188, 2012.
2. K. Kothur, L. Wienholt, F. Brilot, and R. C. Dale. CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: a systematic review. *Cytokine*, vol. 77, pp. 227–237, 2016.
3. A. A. Belogurov Jr. T. A. Zargarova, V. I. Turobov et al.. Suppression of ongoing experimental allergic encephalomyelitis in da rats by novel peptide drug, structural part of human myelin basic protein 4662. *Autoimmunity*, vol. 42, no. 4, pp. 362–364, 2009.

4. A. A. Belogurov Jr. A. V. Stepanov, I. V. Smirnov et al.. Liposome-encapsulated peptides protect against experimental allergic encephalitis. The FASEB Journal, vol. 27, no. 1, pp. 222–231, 2013.

5. R. Furlan, A. Bergami, R. Lang et al. Interferon- β treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon- γ and interleukin-4. Journal of Neuroimmunology, vol. 111, no. 1-2, pp. 86–92, 2000.

АНАЛИЗ УРОВНЯ СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ХЕМУС

Окунола О. Д., Александрова Н.М.

ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

Рассеянный склероз (РС) – аутоиммунное нейродегенеративное заболевание, которое поражает центральную нервную систему (ЦНС). РС развивается когда аутореактивные иммунные клетки проходят через гематоэнцефалитический барьер (ГЭБ) и их пролиферация приводит к воспалению в ЦНС с разрушением миелиновой оболочки нервных клеток [1].

Почти все хронические воспалительные заболевания и иммунопатологии, в том числе рассеянный склероз, связаны с нарушением регуляции цитокинов. Таким образом, очевидно, что уровень цитокинов играет важную роль при развитии рассеянного склероза [2].

Ранее Белогуровым А.А. и др. [3, 4] была показана эффективность иммунодоминантных пептидов основного белка миелина (ОБМ), инкапсулированных в маннозилированных липосомах (Хемус) в подавлении экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЕАЕ). Эта терапевтическая композиция была создана, чтобы вызвать толерантность к ОБМ, белок который разрушается аутореактивными антителами при РС.

Целью наших исследований являлась характеристика изменений уровня цитокинов и соотношение Th1/Th2 после применения Хемус.

В клинических испытаниях участвовали 18 пациентов, которым подкожно вводили общей дозой 2,675мг Хемус в течение 6 недель. Наблюдение проводилось в течение 18 недель. При этом проводился анализ уровня цитокинов в сыворотке крови, полученной от пациентов до введения Хемус, и во время наблюдения (6-18 нед). Проводили анализ 17 цитокинов.

После применения Хемус обнаружили, что уровни цитокинов вернулись к нормальным уровням как у здоровых людей, особенно для ИЛ-2, ИЛ-7, ССЛ2, ССЛ4 и ФНО- α . Однако уровень ИФН- γ не изменился и значительно превышал показания у здоровых людей. Показано, что введение ИФН- β уменьшает секрецию ИФН- γ и ингибирует ИФН- γ -связанные реакции у пациентов РС [5]. Поэтому, терапия Хемус в комбинации с анти-ИФН- γ - препаратом может быть более эффективной.

THE ASSOCIATION OF MITOCHONDRIAL HAPLOTYPES WITH RHEUMATOID ARTHRITIS SEVERITY

Larionova R.¹, Shafigullina A.Z.², Ismagilova R.¹,
Varfolomeev A.¹, Kravtsova O.¹, Arleevskaya M.²

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

Introduction. A huge amount of studies investigates the role of nuclear genes polymorphism in rheumatoid arthritis (RA) predisposition. However, we also complicated with genetic information encoded by mitochondrial DNA (mtDNA), that heritage only by maternal line and the association of the certain mitochondrial haplotypes with several diseases (cardiovascular diseases, cancer etc.) was widely observed. It's well-known that RA 2-3 times more frequently occurs in female rather men. So, the aim of this study was to identify the association of mtDNA haplotypes with RA and it's severity.

Materials and methods. mtDNA haplogroups were determined in 73 RA patient and 30 healthy donors by sequencing the D-loop region (15898-16400 bp according to CRS) and analyzing with online program (<http://dna.jameslick.com/mthap/advanced.php>). The study included cohorts of RA patients and healthy women being under our long-term (more than 10 years) clinical and laboratory surveillance. Clinical and laboratory parameters of RA activity (DAS28-ESR, HAQ, RF, antiCCP, ESR, CRP) were annually fixed. Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

Results. Almost all of the identified mtDNA haplogroups were of the European origin (H, U, J, K) and no significant difference between studied groups was observed. Haplogroup K carriers were significantly less susceptible to the trivial infections in the RA onset when compared to H, J, U haplotypes. In early RA as well as in the advanced RA stage patients with haplogroup K had significantly lower meanings of DAS28-ESR and HAQ compared to the J haplogroup carriers. What is more, in the K subgroup the percentages of RF- and antiCCP+ positive cases were significantly lower than that in the other subgroups. In the H haplotype subgroup all the RA parameters had intermediate values.

Conclusion. Thus, although the presented results are preliminary, our findings demonstrate an impact of the certain mitochondrial haplotypes on the RA severity.

IMPACT OF TOXOPLASMOSIS ON THE SEVERITY AND ACTIVITY OF RHEUMATOID ARTHRITIS

Hadi A.¹, Shuralev E.A.², Takashima Ya.³, Arleevskaya M.I.²

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

³ Gifu University, Gifu, Japan

The pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA), similar to development of a majority of inflammatory and autoimmune disorders, is largely due to an inappropriate or inadequate immune response to environmental challenges. Among these challenges, infectious agents are the undisputed leaders.

Toxoplasmosis is a widespread parasitic disease caused by *Toxoplasma gondii*. Infections with toxoplasmosis usually cause no symptoms in adult humans. The population's infection rates in various regions of Russia range from 15 to 50%, and the incidence of congenital toxoplasmosis among infants is on the average 3-8 children per 1000 births. As the definitive host of *Toxoplasma* is a domestic cat, it is the main source of the infection. The exposure most often occurs through the cat's feces, which can persist in the environment. Direct contact with cat feces (for example, when cleaning a cat's toilet) is not the only and not the most common way of infection. Much more often a person becomes infected with toxoplasmosis through the soil contaminated by cats.

Most often the parasites invade different types of nervous cells, such as neurons, astrocytes and microglial cells in the brain, and Purkinje cells in cerebellum, that entailing neurochemical changes contributing in particular to the mental abnormalities from mood swings and depression to schizophrenia (Fond, 2013, Webster, 2006, Duffy, 2015). Latent toxoplasmosis is associated with immunosuppression (Flegr, 2013). Based on known mechanisms of the mental stress, this condition might trigger RA development and exacerbate its severity (Hsu, 2014). The link of schizophrenia and RA on the contrary is known to be inverse (Torrey, 2001). The immunosuppressive impact of the latent toxoplasmosis might either aggravate, or exert a protective effect on the joint disease, or to play no role in its pathogenesis at all. We aimed to study the impact of latent toxoplasmosis in the severity of RA.

To date, the levels of anti Toxoplasmosis IgG antibodies (antiTOXO) were investigated in 45 with early (eRA) and advanced (aRA) RA patients and 45 control individuals (ELISA).

There was no difference in the ratio of the positive antiTOXO IgG levels in the groups – 24.4% in the controls and 28.3% in the patients. TOXO-positive eRA and aRA patients had the milder course of the disease, as determined by the generally accepted inducers of RA activity and severity (DAS28-ESR, HAQ, ESR, serum CRP levels, the ratio of rheumatoid factor positive and ratio of antiCCP-positive patients). In addition, in the group of the TOXO-positive patients RA debuted 10 years later than in the TOXO-negative one.

ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР С ФИЗИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ И СПОРТИВНОЙ УСПЕШНОСТЬЮ

Валеева Е.В.^{1,2}, Егорова Э.С.², Ахметов И.И.², Кравцова О.А.¹

¹-ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

²-ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Теломеры являются потенциальными маркерами «митотического возраста» клетки и естественным параметром процесса физиологического старения. Установлено, что длина теломер положительно коррелирует с уровнем физической активности, доказывая таким образом, что движение продлевает человеку годы жизни. Целью настоящей работы явилось изучение ассоциации длины теломер с физической активностью и спортивной успешностью. В исследовании приняли участие 921 российский спортсмен (71% мужчин, средний возраст $20,7 \pm 8,4$ года; скоростно-силовые виды спорта ($n=274$), виды спорта на выносливость ($n=58$), единоборства ($n=108$), виды спорта на средние дистанции ($n=186$) и виды спорта со смешанным проявлением физических качеств ($n=295$)) и 689 здоровых, физически неактивных лиц (36% мужчин, $20,8 \pm 16,5$ лет). За среднюю длину теломер брали значение T/S (соотношение количества ДНК с теломерной последовательности к однокопийному участку геномной ДНК), используя количественную ПЦР в реальном времени. В среднем длина теломер всех спортсменов составляла $1,187 \pm 0,098$ против $1,176 \pm 0,132$ контроля ($p=0,049$). В ходе анализа по видам спорта выявлено, что самые длинные теломеры у спортсменов скоростно-силовых видов спорта ($1,197 \pm 0,102$), далее у единоборцев ($1,192 \pm 0,094$), у средневики ($1,964 \pm 0,086$), спортсменов на выносливость ($1,177 \pm 0,118$) и меньшая длина у представителей видов спорта со смешанным проявлением физических качеств ($1,172 \pm 0,101$). Корреляционный анализ показал, что с ростом спортивной квалификации увеличиваются длины теломер спортсменов ($p < 0,0001$, $r=0,15$; ЗМС ($n=3$) - $1,225 \pm 0,075$, МСМК+МС ($n=184$) - $1,206 \pm 0,095$, КМС ($n=263$) - $1,192 \pm 0,101$, с разрядом ($n=174$) - $1,192 \pm 0,098$, без разряда ($n=310$) - $1,169 \pm 0,094$). Полученные нами данные показывают, что спортсмены имеют значимо более длинные теломеры, чем лица контрольной выборки, что может быть обусловлено их повышенным уровнем физической активности. Кроме того, установлено, что чем выше спортивная квалификация, тем длиннее теломеры

**THE VARIANCE OF INFLAMMATION MARKERS IN LIVER DISEASE
INDUCED BY CCl₄ AND CORRECTION BY *L*-ASCORBAT 1-
(2-HYDROXYETHYL)-4,6-DIMETHYL-1,2-DIHYDROPYRIMIDIN-2-ON**

Vyshtakalyuk A.B.¹, Diabankana R.G.K.^{1,2}, Parfenov A.A.^{1,3},
Gumarova L.F.¹, Nazarov N.G.^{1,2}, Zobov V.V.^{1,2}, Bushmeleva K.N.^{1,3}, Sudakov
I.A.^{1,3}, Galyametdinova I.V.¹, Semenov V.E.¹

¹ – IOPC KSC RAS, Kazan, Russia

² – Kazan Federal University, Kazan, Russia

³ – Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia

The compound *l*-ascorbat 1-(2-hydroxyethyl)-4,6-dimethyl-1,2-dihydropyrimidin-2-on (pyrimidine (II)) as the most effective hepatoprotector [1] was revealed among pyrimidine derivatives such as Xymedone medicine (pyrimidine (I)) known as reparation-regeneration treatment. As well the most expressed actoprotective activity among pyrimidine derivatives was discovered for the pyrimidine (II) [2].

The inflammation is one of the components in the pathogenesis of liver diseases. So we studied any cytokines (inflammation markers) in the lysates of rat liver by multiplex analysis on the Magpix unit and Merck reagents for investigation some of the mechanisms of pyrimidine (II) action. Before analysis the mature Wistar male rats were subjected to toxic impact of CCl₄ (5 days, 35% oil solution, per os, the daily dose 1.5 ml/kg of solution). After the toxic damage of liver, we injected pyrimidine (II) intraperitoneally in the doses 0.22 и 2.2 mg/kg that caused expressed improvement of structural-morphological state of liver. As a matter of comparison we studied Thiotriazolinum preparation in the effective dose 2.4 mg/kg in the same conditions. The control group was injected by saline similarly.

The researches of structural-morphological state of liver we carried out by microscope Nikon with digital camera and software program NIS-B. It was shown, on day 3, under pyrimidine (II) in the dose 0.22 mg/kg the area of necrosis and steatosis lesion decreased 2.9 times, on day 7 decreased 7.9 times. On day 3, under pyrimidine (II) in the dose 2.2 mg/kg the area of lesion decreased by 14%, on day 7 decreased 17.1 times in comparison with the control.

The study of cytokines in liver lysates as inflammatory markers showed that in a day after CCl₄ administration IL-1 α , IL-3 and IFN γ were increased. IL-1 β , IL-3, IFN γ increased but IL-1 α decreased on day 3 (figure 1-4). From this is follows that the activation of immune responses is importantly in the development of liver pathology.

The level of pro-inflammatory cytokines IL1- α и IL1- β in experimental groups was lower than in control. Moreover, in pyrimidine (II) groups the decrease of IL1- β was more pronounced in comparison the Thiotriazolinum group. IL-3 и IFN γ under pyrimidine (II) in doses 0.22 and 2.2 mg/kg decreased in contrast the group medicated by thiotriazolinum. The pyrimidine (II) was more effective at the dose of 2.2 mg/kg. Thus, the pyrimidine (II) influenced on the level of 4 cytokines and showed advantage in comparison with thiotriazolinum preparation. The level of cytokines in the blood serum was lower than minimum values (table 1).

Table 1 – Cytokines level in the blood serum (pg/ml)

Group	IL-1 α	IL-1 β	IL-3	IL-4	IFN γ
Control (n=2)	<196.84↓	<2.49↓	<2.01↓	<9.14↓	<2.31↓
	<196.84↓	3.93	<2.01↓	<9.14↓	3.05
Pyrimidine (II) 1.5 mg/kg, per os (n=3)	<196.84↓	<2.49↓	<2.01↓	<9.14↓	<2.31↓
	<196.84↓	<2.49↓	<2.01↓	<9.14↓	<2.31↓
	<196.84↓	10.78	<2.01↓	<9.14↓	<2.31↓
Pyrimidine (I) 0.73 mg/kg, per os (n=1)	<196.84↓	<2.49↓	<2.01↓	<9.14↓	3.9

The research was financed by Russian Science Foundation grant number 14-50-00014.

References:

1. Vyshtakalyuk A.B. Nazarov N.G. Zobov V.V. et al. (2017) Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 162(3), 340-2.
2. Nazarov N.G. Zobov V.V. Vyshtakalyuk A.B. Reznik V.S. (2015) Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 6 (6), 1617-23.

ИЗМЕНЕНИЕ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ CCl₄ И КОРРЕКЦИИ ВЕЩЕСТВОМ L-АСКОРБАТ 1-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)-4,6-ДИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОПИРИМИДИН-2-ОНА

Выштакалюк А.Б.¹, Диабанкана Р.Ж.К.^{1,2}, Парфенов А.А.^{1,3},
Гумарова Л.Ф.¹, Назаров Н.Г.^{1,2}, Зобов В.В.^{1,2}, Бушмелева К.Н.^{1,3},
Судаков И.А.^{1,3}, Галяметдинова И.В.¹, Семенов В.Э.¹

¹ – ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия

² – ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

³ – Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

Среди производных пиримидина, а именно, действующего вещества лекарственного средства регенерационно-репаративного действия Ксимедона (пиримидина (I)), выявлено соединение L-аскорбат 1-(2-гидроксиэтил)-4,6-

диметил-1,2-дигидропиримидин-2-она (пиримидин (II)), обладающее более выраженной гепатопротекторной активностью [1] по сравнению с пиримидином (I). Для этого же соединения выявлена наибольшая актопротекторная активность среди производных пиримидина (I) [2].

Воспаление является одной из составляющих в патогенезе заболеваний печени. В связи с этим, в плане изучения механизмов действия пиримидина (II), методом мультиплексного анализа на приборе Magrix с набором реагентов Merck исследован уровень некоторых цитокинов (маркеров воспаления) в гомогенатах печени крыс, у которых сначала индуцировали токсический гепатит путем 5-кратного перорального введения 35% раствора CCl₄, а затем, в течение 21 дней ежедневно внутривенно вводили пиримидин (II) в дозах 0.22 и 2.2 мг/кг, при которых наблюдали положительное влияние вещества на структурно-морфологические изменения в печени. В качестве вещества сравнения по аналогичной схеме исследовали Тиотриазолин в эффективной дозе 2.4 мг/кг. Контрольной группе аналогично вводили физраствор.

Исследование структурно-морфологических изменений в печени с помощью микроскопа Nikon с цифровой камерой и программным обеспечением NIS-V показали, что под действием пиримидина (II) в дозе 0.22 мг/кг на 3 день площадь поражения печени снизилась в 2.9 раз, на 7 день – в 7.9 раз. При дозе 2.2 мг/кг на 3 день площадь поражения снизилась лишь на 14%, но на 7 день была в 17.1 раз меньше, чем в контроле.

При исследовании цитокинов в качестве маркеров воспаления в гомогенатах печени, было показано, что через сутки после введения CCl₄ были повышены IL-1 α , IL-3 и IFN γ , на 3 день повысились IL-1 β , IL-3, IFN γ , а IL-1 α снизился (рисунок 1-4). Из этого следует, что в развитии патологии печени играет роль активация иммунных ответов, связанных с воспалением.

Таблица 1 – Уровень цитокинов в сыворотке крови (пг/мл)

Группа	IL-1 α	IL-1 β	IL-3	IL-4	IFN γ
Контроль (n=2)	<196.84↓	<2.49↓	<2.01↓	<9.14↓	<2.31↓
	<196.84↓	<u>3.93</u>	<2.01↓	<9.14↓	<u>3.05</u>
Пиримидин (II) 1.5 мг/кг, per os (n=3)	<196.84↓	<2.49↓	<2.01↓	<9.14↓	<2.31↓
	<196.84↓	<2.49↓	<2.01↓	<9.14↓	<2.31↓
	<196.84↓	10.78	<2.01↓	<9.14↓	<2.31↓
Пиримидин (I) 0.73 мг/кг, per os (n=1)	<196.84↓	<2.49↓	<2.01↓	<9.14↓ <9.14↓ <9.14↓	<u>3.9</u>

В опытных группах, уровень провоспалительных цитокинов IL1- α и IL1- β был ниже контроля, причем для пиримидина (II) снижение IL1- β было более выраженным по сравнению с Тиотриазолином (веществом сравнения). IL-3 и IFN γ при введении пиримидина (II) в дозах 0.22 и 2.2 мг/кг снизились, в отличие от группы, леченной Тиотриазолином, при этом в дозе 2.2 мг/кг пиримидина (II) проявлял более выраженный эффект. То есть, пиримидин (II) оказал влияние на уровень 4 цитокинов, проявив преимущество по сравнению с

Тиотриазолином. В сыворотке крови уровень цитокинов в основном был ниже минимальных значений (таблица 1).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант № 14-50-00014.

Список литературы:

1. Vyshtakalyuk A.B. Nazarov N.G. Zobov V.V. et al. (2017) Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 162(3), 340-2.
2. Nazarov N.G. Zobov V.V. Vyshtakalyuk A.B. Reznik V.S. (2015) Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 6 (6), 1617-23.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОСФОРСОДЕРЖАЩИХ АНАЛОГОВ ПРИРОДНЫХ АЛКАЛОИДОВ КОНВОЛЮТАМИДИНОВ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ НА МОДЕЛИ КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННОГО ОТЕКА

Ленина О.А.¹, Выштакалюк А.Б.¹, Гумарова Л.Ф.¹,
Татаринев Д.А.¹, Зобов В.В.^{1,2}, Миронов В.Ф.¹

¹ – ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия

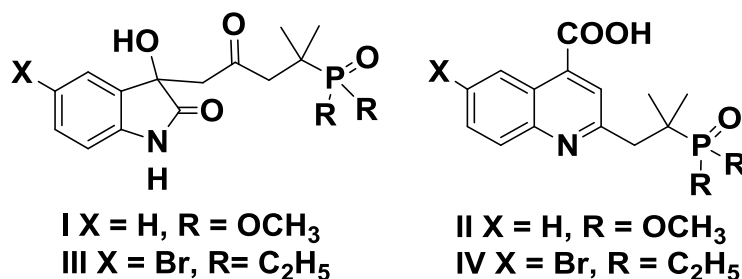
² – ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Острое воспаление является одной из форм врожденной иммунной защиты и представляет собой один из основных ответов на травмы, инфекции и раздражения, опосредованного лейкоцитами. В настоящее время актуален поиск новых противовоспалительных препаратов с высоким терапевтическим индексом, способных купировать процесс воспаления на начальном этапе его развития.

Было показано ранее, что конволютамидины и их производные обладают рядом активностей, среди которых выявлена противомикробная, противоязвенная и противовоспалительная [1-5]. Хинолиновое ядро относится к числу привелигированных гетероциклов и проявляет широчайший спектр биологической активности. В институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова был синтезирован ряд фосфорсодержащих аналогов природных алкалоидов – конволютамидинов и хинолинкарбоновых кислот [6].

Целью настоящего исследования было изучение противовоспалительной активности новых фосфорсодержащих аналогов природных алкалоидов на модели каррагинан-индуцированного отека.

Было протестировано четыре новых фосфорсодержащих аналогов конволютамидинов (I, III) и хинолинкарбоновых кислот (II, IV) в дозах 1/100 и 1/10 от ЛД₅₀ (ЛД₅₀ равно 300 мг/кг, 378 мг/кг, 397 мг/кг, 450 мг/кг соответственно).



Исследуемые соединения растворяли в ДМСО и вводили крысам перорально за час до моделирования отека. Затем через 2, 5, 24 часа после введения каррагинана проводили измерения отека (прибор Plethysmometer фирмы Ugo Basile) и в крови определяли общее количество лейкоцитов (WBC) и их субпопуляций лимфоцитов (Lym), моноцитов (Mon) и гранулоцитов (Gra) на автоматизированном гематологическом анализаторе Mythic 18Vet (закуплен по проекту РФФ грант № 14-50-00014).

По сравнению с контрольной группой, в которой не применяли исследуемые соединения, во всех опытных группах отличий по степени выраженности отека выявлено не было. При исследовании показателей крови было выявлено, что в контрольной группе увеличивалось число лейкоцитов на 2, 5 и 24 ч после введения каррагинана, с пиком на 5 ч. В соотношении субпопуляций лейкоцитов наблюдали снижение Lym на 2 и 5 ч с увеличением через сутки, увеличение Mon и Gra на 2 и 5 ч (пик на 5 ч) с восстановлением через сутки. При введении исследуемых веществ наблюдали уменьшение изменений по сравнению с интактной выборкой показателей крови (число лейкоцитов и соотношение их субпопуляций), что свидетельствует о снижении реактивности иммунной системы.

Наиболее существенные различия с контролем были выявлены для всех исследуемых веществ при введении в дозах 1/100 от ЛД₅₀. Наибольший эффект на исследованные показатели крови проявили соединения I и II, содержащие при фосфоре метоксильные заместители.

Список литературы:

1. Bhriгу B, Pathak D, Siddiqui N, et al. (2010) Int J Pharm Sci Drug Res. 2, 229–35.
2. Hall M.D. Salam N.K. Hellawell J.L. et al. (2009) J. Med Chem. 52, 3191–204.
3. Peddibhotla S. (2009) Curr Bioact Compd, 5, 20–38.
4. Silva B.V. Ribeiro N.M. Vargas M.D. et al. (2010) Dalton Trans, 39, 7338–44.
5. Vine K.L. Matesic L. Locke J.M. Ranson M. Skropeta D. (2008) Anticancer Agents Med Chem, 9, 397–414.
6. Татаринoв Д.А. Осипова В.И. Богданов А.В. и др. (2015) Химия гетероциклических соединений, 51(8), 717-22.

STUDY OF EFFICIENCY OF PHOSPHORUS-CONTAINING ANALOGUES OF NATURAL ALKALOIDS CONVOLUTAMYDINES AS ANTI-INFLAMMATORY AGENT IN MODEL OF CARRAGEENAN-INDUCED EDEMA

Lenina O.A.¹, Vyshtakalyuk A.B.¹, Gumarova L.F.¹, Tatarinov D.A.¹,
Zobov V.V.^{1,2}, Mironov V.F.¹

¹ – IOPC KSC RAS, Kazan, Russia

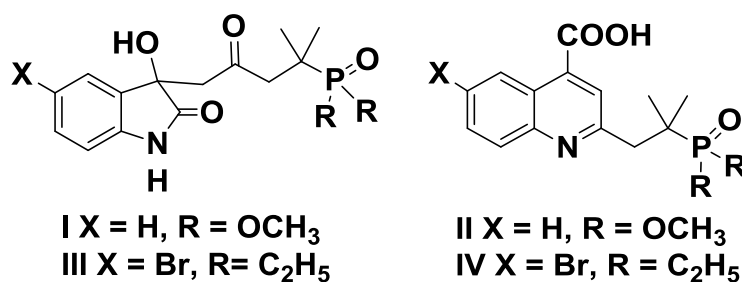
² – Kazan Federal University, Kazan, Russia

Acute inflammation is one of the form of innate immune protection that is one of the major response on injury, infections and irritations via leucocytes. Now the searching of new effective anti-inflammatory preparations that able to stop the inflammation process is very relevant.

Earlier, it was shown that convolutamydines and its derivatives have several activities, for example antimicrobial, antiulcer and anti-inflammatory [1-5]. The quinoline nucleus refers to the number of privileged heterocycles and shows wide range of biological activity. The series of phosphorus analogs of natural alkaloids convolutamydines and quinoline carboxylic acids was synthesized in the A.E. Arbuzov Institute of organic and physical chemistry [6].

The aim of the investigation was study of anti-inflammatory activity of the new phosphorus analogs of natural alkaloids convolutamydines in the carrageenan-induced edema.

It was tested four new phosphorus analogs of convolutamydines (I, III) and quinoline carboxylic acids (II, IV) in doses 1/100 and 1/10 of LD₅₀ (LD₅₀ are 300 mg/kg, 378 mg/kg, 397 mg/kg and 450 mg/kg correspondingly).



Tested compounds were dissolved in the dimethylsulfoxide and administrated per os to rats an hour before the simulation edema. After that we measured an edema 2, 5, 24 hours after injection of carrageenan by device Plethysmometer (Ugo Basile). At the same time we measured leucocytes number (WBC) and subpopulations of them (lymphocytes (Lym), monocytes (Mon) and granulocytes (Gra)) in the blood of rats by the automated hematology analyzer Mythic 18Vet that bought on the funds of Russian Science Foundation grant number 14-50-00014.

The severity of edema in all experimental groups doesn't different from control group that wasn't medicated. It was shown WBC in control group increased after injection of carrageenan through 2, 5 and 24 hours with a maximum of 5 hours.

In the subpopulations ratio we observed the decreasing of Lym through 2 and 5 hours and increasing of them through 24 hours. Mon and Gra increased through 2 and 5 hours peaked for 5 hours and recovered through 24 hours. The changes of blood indices in relation of intact value in experimental groups were less than in control. The obtained results indicate a decrease in the reactivity of the immune system.

The most pronounced differences with control group were observed for all compounds in doses of 1/100 of LD₅₀. The maximum effect on the blood indices was shown for compounds I and II.

References:

1. Bhrigu B, Pathak D, Siddiqui N, et al. (2010) Int J Pharm Sci Drug Res. 2, 229–35.
2. Hall M.D. Salam N.K. Hellawell J.L. et al. (2009) J. Med Chem. 52, 3191–204.
3. Peddibhotla S. (2009) Curr Bioact Compd, 5, 20–38.
4. Silva B.V. Ribeiro N.M. Vargas M.D. et al. (2010) Dalton Trans, 39, 7338–44.
5. Vine K.L. Matesic L. Locke J.M. Ranson M. Skropeta D. (2008) Anticancer Agents Med Chem, 9, 397–414.
6. Tatarinov D.A. Osipova V.I. Bogdanov A.V. et al. (2015) Chemistry of Heterocyclic compounds, 51(8), 717-22.

POTENTIAL USE OF FLUORIDE NANOPARTICLES AND RARE EARTH DOPED FLUORIDE NANOPARTICLES (PRF₃, LAF₃, PR:LAF₃) IN BIOMEDICINE (PHOTODYNAMIC THERAPY): CYTOTOXICITY AND PHOTOTOXICITY

Pudovkin M.S., Zelenikhin P.V., Krashenninnicova A.O., Nizamutdinov A.S., Ferraro A., Semashko V.V., Pavlov V.V.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Rare-earth doped fluoride nanoparticles (NPs) are promising photosensitizers for photodynamic therapy. In this study intrinsic cytotoxicity and photoinduced toxicity of two different preparations of Pr:LaF₃ (C_{Pr}=30%), PrF₃ and LaF₃ NPs were explored. NPs intrinsic cytotoxicity was tested toward four eukaryotic cell-model systems (A459, SW837, MCF7 and Colo320, human tumor cell lines) and prokaryotic (*Salmonella typhimurium TA 100*) as well. Cancer cell overgrowth (A459, SW837 and MCF7) was detected after treatment with the first NPs preparation at three concentrations (5mM, 1mM, 0.5mM). To overcome this issue, a new NPs synthesis was performed. New Pr:LaF₃ NPs (hydrodynamic radius 18 ± 1 nm) were not toxic toward Colo320 and *Salmonella* cells at millimolar concentrations (survival 96% and 94% for 1 mM and 0.5 mM respectively), whereas for the other 3 cell lines experiments are ongoing. NPs photoinduced toxicity was obtained with lasers at 473, 532, 605, and 750 nm continuous wave (CW) as well as pulse lasers

(average power density 1.3 mW/cm^2). Best phototoxicity was achieved in *Salmonella* in presence of Pr:LaF₃ (survival of 51%, 20%, 36%, and 29% for 473, 532, 605 and 750 nm respectively). Furthermore, pulse laser irradiation itself was toxic for bacteria at 1.3 mW/cm^2 and the survivals were 62%, 61%, 48%, and 46% for 473, 532, 605 and 750 nm respectively. Survivals of the bacteria for 473, 532 nm CW irradiations were 25%, 41% for 473 nm, 532 nm respectively. Finally, 473, 532 nm CW laser irradiations were not toxic against bacteria at 1.3 mW/cm^2 .

ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ PRF₃, LAF₃, PR:LA F₃ ДЛ Я БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Пудовкин М.С., Зеленихин П.В., Павлов В.В., Морозов О.А., Лукинова Е.В.,
Коряковцева Д.А., Семашко В.В.

ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

В настоящее время активно развиваются такие высокотехнологичные методы лечения раковых опухолей, как фотодинамическая терапия, а так же гибридные фототермальная-/фотодинамическая и радио-/фотодинамическая терапии, которые осуществляются при облучении опухолей рентгеновским, видимым или инфракрасным излучениями. Локализованные в опухоли наночастицы (наносцинтилляторы (НС)), конъюгированные с фотосенсибилизаторами (ФС), эффективно переизлучают падающее излучение в видимый свет нужных длин волн, активируя ФС. В данных видах терапий очень актуальным является температурный контроль облучаемой области во время терапии, поэтому очень востребованы термочувствительные НС, работающие в физиологическом диапазоне температур (10-50 °С). В качестве таких НС предлагается использовать наночастицы трифторидов, активированные ионами редкоземельных элементов. Благодаря хорошим оптическим свойствам, низкой токсичности, термочувствительности в физиологическом диапазоне температур, простым и экономичным методам синтеза данные наночастицы являются очень перспективным наноматериалом для указанных терапий. В данной работе, мы приводим данные об исследовании мультифункциональных термочувствительных наночастицах LaF₃:Pr (12%). Наночастицы были синтезированы методом со-осаждения в растворе. Размер и форма исследовались методом просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения. Фазовый состав наночастиц определялся методом рентгеноструктурного анализа. Изменения жизнеспособности опухолевых клеток (colo 320) в присутствии НЧ оценены в МТТ-тесте. Люминесценция наночастиц возбуждалась импульсным лазером (длительность импульса 10 нс, частота следования импульсов 10 Гц) на длине волны 444 нм. Регистрация спектров люминесценции производилась спектрометром StellarNet с разрешением 0.5 нм. Было выявлено, что наночастицы LaF₃:Pr (12%) представляют собой нанокристаллы гексагональной

структуры, соответствующей матрицам LaF_3 и PrF_3 со средним диаметром порядка 18 ± 5 нм. Выживаемость клеточной культуры солю 320 при концентрации НЧ 0.05 мМ, 0.5 мМ, 5 мМ и 25 мМ составила 98%, 94%, 75% и 37% соответственно. Измерения зависимости интенсивности полос люминесценции от температуры показали, что отношение пиковых интенсивностей на длинах волн 483 и 523 нм, соответствующих переходам $^3\text{P}_0$ - $^3\text{H}_4$ и $^3\text{P}_0$ - $^3\text{H}_5$ соответственно, при изменении температуры от 7°C до 47°C , увеличивается в 1,25 раза. Таким образом, наночастицы $\text{LaF}_3:\text{Pr}$ (12%) не токсичны при микромолярных концентрациях, обладают термочувствительностью в физиологическом диапазоне температур. Полосы испускания данных НЧ соответствуют полосам поглощения таких ФС, как акридин и цианин. Все это дает основания полагать, что наночастицы $\text{LaF}_3:\text{Pr}$ (12%) могут быть использованы в качестве НС для фотодинамической терапии, а так же гибридных фототермальной-/фотодинамической и радио-/фотодинамической терапий.

PRACTICAL APPLICATION OF BIACORE T200 BIOSENSOR IN BIOMEDICAL RESEARCH

Aleksandrova N.M.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Federal center of toxicological, radiating and biological safety of laboratory of
biochemistry and molecular genetic analysis

Optical biosensors BIACORE work on the surface plasmon resonance effect.

The effect of surface plasmon resonance Surface Plasmon Resonance (SPR) was discovered in 1960 SPR relates to the field of quantum nanooptics.

The mobility of the plasmon and the magnitude of the resonance angle depend on the interaction of the plasmon field Evanescence with the environment behind the mirror that lets us "look from the other side of the mirror". The value of the resonant angle is proportional to the refractive index in a thin layer medium for the gold (~ 300 nm). Tracking the change in resonant angle can be captured for mass transfer of any substance between a free environment and this layer. On the surface of the optical chip is fixed one partner of intermolecular interactions. The biosensor registers the mass-transfer of second partner of interaction between the environment and the measurement zone at the surface of the optical chip.

Both partners - any objects from low molecular weight substances to larger supramolecular structures (e.g. micelles, liposomes, viruses, and even cells).

The advantages of optical biosensors Biacore

- Quantitative analysis over a wide dynamic range of analyte concentrations (~ 9 orders of magnitude)
- Highest sensitivity when working with low molecular weight analyte (limit of detection ≥ 50 and Biacore T200 - no restrictions)

- Microfluidic system with variable topology IFC Microfluidic System - a microfluidic integrated module with controllable oil-hydraulic / pneumatic microcephaly
- 4 liquid flow-through nano-cuvettes 20 nl ($2 \cdot 10^{-8}$ l)
- 4 optical registration system SPR
- 4 e-channel recording
- Developed software - management, analysis and modeling - flexible planning and programming of experiments - a high level of automation
- The possibility of a molecular "fishing"

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БИОСЕНСОРА VIACORE T200 В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Александрова Н.М.

ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань, Россия

Оптические биосенсоры VIACORE работают на эффекте поверхностного плазмонного резонанса.

Эффект поверхностного плазмонного резонанса Surface Plasmon Resonance (SPR) был открыт в 1960 г. SPR относится к области квантовой нанооптики.

Подвижность плазмона и величина резонансного угла, зависит от взаимодействия эванесцентного поля плазмона со средой за зеркалом, что позволяет «заглянуть в зазеркалье». Величина резонансного угла пропорциональна коэффициенту преломления в тонком слое среды за золотом (~ 300 нм). Отслеживая изменение резонансного угла можно регистрировать массоперенос любых веществ между свободной средой и этим слоем. На поверхности оптического чипа закрепляется один партнер межмолекулярного взаимодействия. Биосенсор регистрирует массо-перенос второго партнера взаимодействия между средой и зоной измерения у поверхности оптического чипа.

Оба партнера - любые объекты от низкомолекулярных веществ до крупных надмолекулярных структур (например, мицеллы, липосомы, вирусы и даже клетки).

Преимущества оптических биосенсоров Viacore

- Количественный анализ в широком динамическом диапазоне концентраций аналита (~ 9 порядков)
- Рекордно высокая чувствительность при работе с низкомолекулярными аналитами (порог детекции ≥ 50 Да, а у Viacore T200 - без ограничений)

- Микрожидкостная система с изменяемой топологией IFC Microfluidic System - микрожидкостной интегральный модуль с управляемыми пневмо-гидравлическими микрочапками
- 4 жидкостных проточных нано-кюветы 20 нл ($2 \cdot 10^{-8}$ л)
- 4 оптических системы регистрации SPR
- 4 электронных канала регистрации
- Развитое программное обеспечение - управление, анализ и моделирование - гибкое планирование и программирование экспериментов - высокий уровень автоматизации
- Возможность молекулярной «рыбалки» (фишинга)

ANALYSIS OF ATOMIC FLUCTUATIONS IN THE DNA-ANTIBODY COMPLEXES

Akberova N.I.¹, Zhmurov A.A.², Nevzorova T.A.¹, Litvinov R.I.^{1,3}

¹Kazan Federal University, Kazan, Russia

²Moscow Institute of Physics & Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA

Antibodies against double-stranded DNA play an important role in the pathogenesis of autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus. Structural analysis of antibody-DNA complexes provides an insight into the role of DNA-containing immune complexes in human pathology and can help in the development of new diagnostic and therapeutic methods. Here we investigated the structures of complexes formed by a Fab fragment of an anti-DNA antibody with double-stranded DNA (dsDNA) containing or not containing a thymine dimer, using the equilibrium molecular dynamics. Simulation trajectories were analyzed by the principal component and normal mode methods.

It was found that removal of the covalent bond in the thymine dimer led to changes in the structural dynamics of the light and heavy Fab chains and also of the DNA chains. A significant increase in the mobility of the Fab light chain with higher fluctuation amplitude was observed throughout the entire simulation in the region of contacts with DNA in the structure without the thymine dimer, indicating weakening of the interaction between the Fab fragment and the dsDNA segment. Removal of the covalent cross-linking between thymine residues also caused a significant decrease in the energy of non-covalent interactions in the Fab-fragment/dsDNA interface, both electrostatic and van der Waals. A principle component analysis made it possible to identify the most significant collective atomic motions and to determine their contribution to the conformational changes. Analysis of such movements in the DNA chains bound to the antibody revealed that the biggest fluctuations occurred at the ends of both DNA chains. These bending motions are functionally important for the interaction of the antibody with dsDNA. Our findings shed light on the formation and properties of pathogenic anti-DNA antibodies associated with DNA photodamage, resulting in formation of cross-linked thymine dimers.

АНАЛИЗ АТОМНЫХ ФЛУКТУАЦИЙ В КОМПЛЕКСАХ ДНК-АНТИТЕЛО

Акберова Н.И.¹, Жмуров А.А.², Невзорова Т.А.¹, Литвинов Р.И.^{1,3}

¹ ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

³ Медицинский факультет Пенсильванского университета, Филадельфия, США

Антитела против двухцепочечной ДНК играют важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний. Структурный анализ комплексов антитело-ДНК способствует пониманию роли ДНК-содержащих иммунных комплексов в патологии человека и может помочь в разработке новых методов диагностики и лечения. В данной работе, используя метод равновесной молекулярной динамики, мы исследовали структуры комплексов, образованных *Fab*-фрагментом антитела с двухцепочечной ДНК (дцДНК), содержащей или не содержащей тиминный димер. Траектории молекулярной динамики анализировали с использованием методов главных компонент и нормальных мод.

Установлено, что удаление ковалентной связи в тиминном димере приводит к изменениям структурной динамики легких и тяжелых цепей *Fab*, а также цепей ДНК. Существенное повышение подвижности легкой цепи *Fab* с более высокой амплитудой флуктуаций наблюдалось на протяжении всей симуляции в области контактов с ДНК в структуре без тиминного димера, что указывает на их ослабление взаимодействия между *Fab*-фрагментом и дцДНК. Удаление ковалентной сшивки между тиминами также вызывает значительное уменьшение энергии нековалентных взаимодействий в интерфейсе *Fab*-фрагмент-дцДНК, как электростатических, так и ван-дер-Ваальсовых. Метод главных компонент позволил выявить наиболее значимые совместные атомные движения и определить их вклад в конформационные изменения. Анализ таких движений в цепях ДНК в изученных комплексах с антителом выявил, что наибольшие флуктуации локализуются на концах обеих цепей ДНК; это позволяет предположить, что эти изгибающие движения являются функционально значимыми для взаимодействия антитела с дцДНК.

CONFORMATIONAL CHANGES IN CYCLOSPORIN INDUCED BY SOLVENT EFFECTS AND METAL IONS

Efimov S.V., Zgadzay Yu.O., Slivka A.V.,
Mikheeva O.G., Klochkov V.V.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Cyclosporin A (CsA) is an immunosuppressor used in treatment of autoimmune diseases and after transplantation of organs. Interaction of CsA with cyclophilin (Cyp18) requires cis-trans isomerization of a certain peptide bond. Moreover, its structure shows a variety of conformations depending on properties of the solvent (polarity) and presence of metal ions. Conformational behaviour of CsA is studied in our work.

It is a well-established fact that cyclosporin in solution adopts different conformations distinguished by their NMR spectra [1, 2]. Solvent properties influence the composition of the equilibrium ensemble of the conformers; in polar solvents there exist many conformers, and their fractions at the room temperature differ insignificantly [2, 3]. Furthermore, equilibrium is modified when some ions are present in the solvent, e.g. magnesium, calcium or sodium [4].

We observed behaviour of cyclosporin in DMSO and methanol when interacting with Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Gd^{3+} ions. Measurements were carried out on a Bruker Avance II 500 spectrometer (Center for Shared Facilities, KFU). No significant effect was observed upon adding cobalt and gadolinium salts, which would be noticed from amide resonances in NMR spectra. Addition of zinc causes a shift of one of the NH signals, which grows as the ion concentration increases. Moreover, a reversible effect of shift and disappearing of signals was revealed when Mg^{2+} and Zn^{2+} were added, which gives an evidence of transitions processes with characteristic times on the order of seconds and minutes.

1. S.V. Efimov [et al.] (2013) *J. Mol. Struct.* 1036, 298-304.
2. S. Efimov, Yu. Zgadzay, V. Klochkov (2014) *Appl. Magn. Reson.* 45, 1225-35.
3. S.Y. Ko, C. Dalvit (1992) *Int. J. Peptide Protein Res.* 40, 380-2.
4. J.A. Carver [et al.] (1992) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 22, 1682-4.

ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ ЦИКЛОСПОРИНА, ВЫЗВАННЫЕ ВЛИЯНИЕМ РАСТВОРИТЕЛЯ И ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ

Ефимов С.В., Згадзай Ю.О., Сливка А.В.,
Михеева О.Г., Клочков В.В.

ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Циклоспорин А (CsA) – иммуноподавляющее средство, используемое при лечении аутоиммунных заболеваний и при трансплантации органов. Взаимодействие молекул CsA и циклофилина (Cyp18) требует цис-транс изомеризации одной из пептидных связей. Более того, структура циклоспорина обладает заметной конформационной мобильностью в зависимости от свойств растворителя (полярности) и присутствия ионов. В настоящей работе изучается конформационное поведение CsA.

Ранее отмечалось, что циклоспорин в растворе может образовывать различные конформеры, идентифицируемые по спектрам ЯМР [1, 2]. Свойства растворителя влияют на состав равновесного ансамбля конформеров, причём в полярных растворителях набор конформеров богаче, а населённости разных форм при комнатной температуре сопоставимы [2, 3]. Кроме того, баланс равновесия смещается при наличии в растворе некоторых ионов – магния, кальция, натрия [4].

В нашей работе рассмотрено поведение циклоспорина в ДМСО и метаноле во взаимодействии с ионами Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Gd^{3+} . Измерения выполнены на спектрометре Bruker Avance II 500 (ФЦКП ФХИ). Значительного эффекта на конформационное равновесие, который был бы заметен по сигналам NH протонов, не наблюдалось при добавлении солей кобальта и гадолиния. Добавка цинка вызывает смещение одного из NH сигналов, увеличивающееся по мере роста концентрации ионов. Кроме того, при добавлении Mg^{2+} и Zn^{2+} наблюдается обратимый эффект смещения или исчезновения некоторых сигналов, который свидетельствует о переходных процессах, завершающихся за время порядка нескольких секунд и минут.

1. S.V. Efimov [et al.] (2013) *J. Mol. Struct.* 1036, 298-304.
2. S. Efimov, Yu. Zgadzay, V. Klochkov (2014) *Appl. Magn. Reson.* 45, 1225-35.
3. S.Y. Ko, C. Dalvit (1992) *Int. J. Peptide Protein Res.* 40, 380-2.
4. J.A. Carver [et al.] (1992) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 22, 1682-4.

PRODUCTION OF RECOMBINANT LENTIVIRUSES ENCODING ANTI-TUMOUR HUMAN CYTOKINES

Chulpanova D.S., Kolobynina K.G., Solovyeva V.V., Rizvanov A.A.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Cytokines are molecular messengers that allow cells of the immune system to interact with each other. Cytokines directly stimulate immune effector cells and stromal cells thereby regulating a tumour and its microenvironment development. Numerous cell cultures and animal tumour models studies have shown that cytokines have broad anti-tumour activity. Targeted cancer therapy by using therapeutic human cytokines gene constructs is a very promising treatment strategy.

Recombinant plasmids encoding Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10 (TNFSF10, TRAIL), Interferon alpha-17 (IFNA17), Interleukin-2 (IL-2), Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) were constructed in this research. The plasmid constructions encoding described cytokines were subcloned from pDONR221 Donor vector into the pLX303 (Addgene, USA) Donor plasmid by LR-recombination (Gateway technology, Invitrogene, USA). Chemically competent *E. coli* cells were transformed by the recombination products. Positive clones were tested for the presence of target genes by bacterial colonies PCR screening with vector specific primers and agarose gel electrophoresis of DNA. Isolated from the positive clones plasmid DNA was analyzed by restriction analysis with KpnI and XhoII restriction enzymes (ThermoFisher Scientific, USA).

Recombinant lentiviruses were produced by co-transfection of the HEK293FT packing cell line with three plasmids: encoding target gene Vector plasmid; encoding gag/pol genes and additional viral genes packaging plasmid (pCMV-dR8.2 dvpr, Addgene, USA); and encoding Glycoprotein G of the vesicular stomatitis virus gene plasmid (pCMV-VSV-G, Addgene, USA). The produced lentiviruses were concentrated by ultracentrifugation for 2 hours at 26,000 rpm. The viral titer was determined by flow cytometry of cells transfected with lentiviruses carrying a green fluorescent protein (GFP) gene.

The functionality and antitumor activity of the viruses will be further investigated in different tumor cell cultures *in vitro*.

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ, КОДИРУЮЩИХ ГЕНЫ ЦИТОКИНОВ ЧЕЛОВЕКА

Чулпанова Д.С., Колобынина К.Г., Соловьева В.В., Ризванов А.А.

ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Цитокины представляют собой молекулярные мессенджеры, которые позволяют клеткам иммунной системы взаимодействовать друг с другом. Цитокины непосредственно стимулируют иммунные эффекторские клетки и стромальные клетки, тем самым регулируя развитие опухоли и ее микроокружения. Многочисленные исследования на культурах клеток и животных опухолевых моделях показали, что цитокины обладают широкой противоопухолевой активностью. Актуальным направлением исследований является таргетная терапия онкологических заболеваний с использованием генных конструкций, экспрессирующих различные цитокины с противоопухолевой активностью.

В настоящей работе были получены рекомбинантные плазмидные конструкции, кодирующие гены фактора некроза опухоли (ФНО, TNFSF10), интерферона α (ИФН- α , IFNA17), интерлейкина-2 (ИЛ-2, IL-2), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ, CSF-2) и фосфатазы с двойной субстратной специфичностью (PTEN). Плазмидные конструкции на основе вектора pLX303 (Addgene, США), кодирующие гены вышеописанных цитокинов, были получены путем субклонирования из ранее полученного вектора-донора pDONR221 методом LR-рекомбинации (технология Gateway, Invitrogen, США). Продуктами рекомбинации трансформировали компетентные клетки *E. coli*. Позитивные клоны бактерий были проверены на наличие целевых генов с помощью ПЦР скрининга бактериальных колоний с вектор-специфичными праймерами и электрофореза ДНК в агарозном геле. Выделенная из положительных клонов плазмидная ДНК была проанализирована рестрикционным анализом с эндонуклеазами рестрикции KpnI и XhoII (ThermoFisher Scientific, США).

Рекомбинантные лентивирусы были получены путем ко-трансфекции пакующей линии клеток HEK293FT тремя плазмидами: векторной плазмиды, несущей целевой ген; плазмиды, несущей гены оболочки gag/pol и дополнительные гены вириона (pCMV-dR8.2 dvpr, Addgene, США); и плазмиды, несущей ген гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (pCMV-VSV-G, Addgene, США). Полученные лентивирусы концентрировали с помощью ультрацентрифугирования в течение 2 часов при 26 000 об/мин. Вирусный титр определяли методом проточной цитофлуориметрии клеток, зараженных собранным в параллели лентивирусом, несущим ген зеленого флуоресцентного белка (GFP).

Функциональность и противоопухолевая активность полученных вирусов будет исследована в дальнейшем на различных культурах опухолевых клеток *in vitro*.

CONFORMATIONAL PREFERENCE OF SOME NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

Khodov I.A.^{1,2}, Efimov S.V.¹, Belov K.V.²,
Klochkov V.V.¹, Kiselev M.G.²

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry of Russian Academy of Sciences,
Ivanovo, Russia

To understand the pharmacological properties of nonsteroidal anti-inflammatory compounds, knowing of their molecular structure and conformational preference is necessary. In this work, we consider two widely used anti-inflammatory drugs: ibuprofen and mefenamic acid.

Ibuprofen is a nonsteroidal anti-inflammatory drug used in treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and other diseases for pain relief and alleviation of fever. It has an outstanding biological activity among substituted phenylalkane and alkene acids. Commercially available ibuprofen contains a racemic mixture of both enantiomers, from which only the S(+) form is pharmacologically active. The inactive R(-) ibuprofen, however, may undergo a unidirectional chiral inversion into the active S(+) form in vivo [1]. Early we are investigated the solution of an anti-inflammatory drug ibuprofen in chloroform by nuclear magnetic resonance spectroscopy 2D NOESY. Since ibuprofen is known to exist as an ensemble of different conformation structures, atom-atom distances are averaged over the ensemble. To compare experimental and calculated distances, three models of averaging were concerned. Our data allowed to determine the dominant conformers of ibuprofen dissolved in chloroform. The population of conformers in the saturated solution leads to a certain crystal morphology formed within the nucleation process [2].

Mefenamic acid is a nonsteroidal anti-inflammatory drug used widely as an antipyretic, analgesic and antirheumatic drug, and which is also indicated for pain related to menstrual disorders. This compound is a potent prostaglandin synthetase inhibitor, commonly used as an analgesic antipyretic agent. We are used the same NMR 2D NOESY approach whine like for ibuprofen for obtained of the atom-atom distances. But in this case we investigated the solution in DMSO because for mefenamic acid is characteristic of low solubility in chloroform.

Experimental 2D NOESY data and X-ray results are compared to elucidate the nucleation mechanism. Influence of the spin diffusion effect on the accuracy of determination of conformational distribution is discussed.

1. Khodov I.A., Efimov S.V. Klochkov V.V., Batista De Carvalho L.A.E. Kiselev M.G. (2016) Journal of Molecular Structure, 1106, 373-81.

2. Khodov I.A., Efimov S.V. Klochkov V.V., Alper G.A. Batista De Carvalho L.A.E. (2014) European Journal of Pharmaceutical Sciences, 65, 65-73.

This work was funded by the subsidy of the Russian Government to support the Program of Competitive Growth of Kazan Federal University among World's Leading Academic Centers.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПРЕДПОЧТЕНИЯ НЕКОТОРЫХ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ

Ходов И.А.^{1,2}, Ефимов С.В.¹, Белов К.В.²,
Клочков В.В.¹, Киселев М.Г.²

¹ ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук, Иваново, Россия

Для понимания фармакологических свойств нестероидных противовоспалительных соединений необходимо знать их молекулярную структуру и конформационные предпочтения. В данной работе рассмотрены два известных противовоспалительных лекарства - ибупрофен и мефенаминовая кислота.

Ибупрофен - нестероидное противовоспалительное лекарственное средство, которое используется при лечении остеоартрита, ревматоидного артрита и других заболеваний для снятия боли и облегчения лихорадки. Он обладает хорошей биологической активностью среди замещенных фенилалканов и алкеновых кислот. Коммерчески доступный ибупрофен содержит рацемическую смесь обоих энантиомеров, однако только S (+) форма является фармакологически активной. Кроме того неактивная R (-) форма ибупрофена может подвергаться однонаправленной хиральной инверсии в активную S (+) -форму *in vivo* [1]. В данной работе было проведено исследование раствора ибупрофен в хлороформе с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Поскольку известно, что ибупрофен существует как ансамбль различных конформационных структур, то искомые атом-атомные расстояния усредняются по ансамблю. Для сравнения экспериментальных и расчетных расстояний были рассмотрены три модели усреднения. Наши данные позволили определить доминирующие конформеры ибупрофена, растворенного в хлороформе. Заселенность конформеров в насыщенном растворе приводит к определенной морфологии кристаллов, образующейся в процессе нуклеации [2].

Мефенаминовая кислота - нестероидное противовоспалительное лекарственное средство, широко используемое как жаропонижающее, болеутоляющее и противоревматическое средство, и которое также показано для лечения боли, связанной с нарушениями менструального цикла. Это соединение является сильным ингибитором простагландинсинтетазы, обычно используемым в качестве обезболивающего жаропонижающего средства. Мы используем тот же подход ЯМР 2D NOESY, что и для ибупрофена, для

получения расстояний между атомами. Но в данном случае мы исследовали раствор в ДМСО, потому что для мефенамовой кислоты характерна низкая растворимость в хлороформе.

Проведено сравнение экспериментальных данных 2D NOESY и рентгеноструктурного анализа для выяснения механизма зарождения. В данной работе обсуждается влияние эффекта спиновой диффузии на точность определения конформационного распределения. Механизм нуклеации изучается через сравнение экспериментальных данных спектроскопии ЯМР NOESY и рентгеновской дифракции.

1. Khodov I.A., Efimov S.V. Klochkov V.V., Batista De Carvalho L.A.E. Kiselev M.G. (2016) *Journal of Molecular Structure*, 1106, 373-81.

2. Khodov I.A., Efimov S.V. Klochkov V.V., Alper G.A. Batista De Carvalho L.A.E. (2014) *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65, 65-73.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

SPATIAL STRUCTURE OF THE COMPLEX OF AMYLOID PEPTIDE A β ₁₃₋₂₃ WITH Mn²⁺ AND Co²⁺ BASED ON NMR DATA

Abdrakhmanov R Zh., Blokhin D.S., Usachev K.S., Klochkov V.V.

Kazan Federal University, Kazan

In this paper, the interaction of a fragment of beta-amyloid peptide A β ₁₃₋₂₃ with Mn²⁺ and Co²⁺ ions is considered. The interaction of A β ₁₃₋₂₃ with a metal ion was studied using modern NMR spectroscopy methods. NMR spectroscopy data obtained to date for beta-amyloid and its fragments state that the peptide in the aqueous solution has an unordered conformational state, and in the medium the imitating biological membrane assumes the structure in the form of an α -helix [1]. Fragment A β ₁₃₋₂₃ contains the supposed center of aggregation [2]. The study of A β ₁₃₋₂₃ with Mn²⁺ and Co²⁺ ions will give us information on the interaction of the A β peptide with metal ions. The experiments were performed on 500 MHz NMR spectrometer (Bruker, AVANCE II-500).

Manganese complexes. An increase in the concentration of the manganese salt to A β ₁₃₋₂₃ causes a selective and progressive broadening of the NMR signal lines, and an increase in the proton relaxation time is observed, which allows observing amino acid residues that have a non-vanishing dipolar or scalar interaction with the electron spin of the Mn²⁺ ion. The most noticeable disappearance of signals in one-dimensional ¹H NMR spectra, at high concentrations of Mn²⁺ ions, was observed in the NH region of the amino acid residue of aspartate D23 [3]. Conformational search module implemented in the molecular modeling and computational chemistry

software GROMACS was used to find stable structures of the starting peptide and to minimize the energy by removing unlikely geometrical features.

Cobalt complexes. The gradual addition of the CoCl_2 salt to $\text{A}\beta_{13-23}$ causes a selective broadening of the NMR signal lines. Titration of the peptide by increasing the concentration of the salt CoCl_2 from 1:0 to 1:0.1 (molar ratio of peptide-metal). The broadening and shift of the signals of the β - groups of the amino acid residues D23 and Q15 to the weak - field region is observed on the spectra.

Result. The most noticeable disappearance of signals in two-dimensional spectra, at high concentrations of Mn^{2+} ions, was observed in the NH region of the amino acid residue of aspartate D23. This can be caused by the screening of aspartate by manganese ion due to the close arrangement of the ion and aspartate to each other.

In the study of $\text{A}\beta_{13-23}$ with a cobalt salt, NMR signal broadening of the amino acid residues D23 and Q15 was observed. On the basis of this, it can be assumed that the Co^{2+} ion approaches these amino acid residues.

References:

1. Gaggelli E. Janicka-Klos A. Jankowska E. Kozlowski H. Migliorini C. Molteni E. (2008). NMR Studies of the Zn^{2+} Interactions with Rat and Human β -Amyloid (1-28) Peptides in Water-Micelle Environment *J. Phys. Chem. B*, 112, 100-109.
2. Usachev K. S. Filippov A. V. Filippova E. A. Antzutkin O. N. Klochkov V. V. (2013). *Journal of Molecular Structure*, 1049, 436–440. doi:10.1016/j.molstruc.2013.06.043.
3. Abdrakhmanov R. J. Blokhin D. S. Usachev K. S. Karataeva F. Kh. Klochkov V. V. (2016) *Journal of Bionanoscience*. doi: 10.1007/s12668-016-0317-7

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ КОМПЛЕКСА БЕТА-АМИЛОИДА $A\beta_{13-23}$ С ИОНАМИ Mn^{2+} и Co^{2+} НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ЯМР

Абдрахманов Р.Ж., Блохин Д.С., Усачев К.С., Клочков В.В.

ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

В данной работе рассмотрено взаимодействие фрагмента бета-амилоидного пептида $A\beta_{13-23}$ с ионами Mn^{2+} и Co^{2+} . Исследование взаимодействия $A\beta_{13-23}$ с ионом металла проводилось с помощью современных методов ЯМР-спектроскопии.

Данные ЯМР спектроскопии, полученные на сегодняшний день для бета-амилоида и его фрагментов, утверждают, что пептид в водном растворе имеет неупорядоченное конформационное состояние, а в среде имитирующую биологическую мембрану принимает структуру в виде α -спирали [2]. Фрагмент $A\beta_{13-23}$ содержит предполагаемый центр агрегации [3]. Изучение $A\beta_{13-23}$ с ионами Mn^{2+} и Co^{2+} даст нам информацию о взаимодействии пептида $A\beta$ с ионами металлов. Эксперименты были выполнены на спектрометре Bruker Avance II 500 (ФЦКП ФХИ).

Комплекс с ионами марганца.

Увеличение концентрации соли марганца к $A\beta_{13-23}$ вызывает селективное и прогрессирующее уширение линий ЯМР-сигналов, а также наблюдается увеличение времени релаксации протонов, что позволяет наблюдать аминокислотные остатки, которые имеют исчезающее дипольное или скалярное взаимодействие со спином электрона иона Mn^{2+} . Наиболее заметное исчезновение сигналов в одномерных 1H ЯМР спектрах, при больших концентрациях ионов Mn^{2+} , наблюдалось в NH-области аминокислотного остатка аспартата D23.

Изначальная структура пептида $A\beta_{13-23}$ была взята из работы [3]. Оптимизация геометрии структуры пептида $A\beta_{13-23}$ с ионом Mn^{2+} , выполнена на программном обеспечении молекулярного моделирования GROMACS с использованием силового поля AMBER.

Комплекс с ионами кобальта. Постепенное добавление соли кобальта $CoCl_2$ к $A\beta_{13-23}$ вызывает селективное уширение линий ЯМР-сигналов. Проведено титрование пептида путем увеличения концентрации соли $CoCl_2$ от 1:0 до 1:0.1 (молярное соотношение пептид-металл). На спектрах наблюдается уширение и смещение сигналов β – групп аминокислотных остатков D23 и Q15 в область слабого поля.

Выводы.

Наиболее заметное исчезновение сигналов в двумерных спектрах, при больших концентрациях ионов Mn^{2+} наблюдалось в NH-области аминокислотного остатка аспартата D23. Это может быть вызвано экранированием аспартата ионом марганца вследствие близкого расположения иона и аспартата друг к другу.

При исследовании $A\beta_{13-23}$ с солью кобальта наблюдалось уширение ЯМР сигналов аминокислотных остатков D_{23} и Q_{15} . На основании этого можно предположить, что ион Co^{2+} приближается к этим аминокислотным остаткам.

1. Gaggelli E. Janicka-Klos A. Jankowska E. Kozlowski H. Migliorini C. Molteni E. (2008). NMR Studies of the Zn^{2+} Interactions with Rat and Human β -Amyloid (1-28) Peptides in Water-Micelle Environment J. Phys. Chem. B, 112, 100-109.

2. Coles, M. Bicknell, W. Watson, A. A. Fairlie, D. P. and Craik, D. J. (1998). Solution structure of amyloid β -peptide (1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is? Biochemistry 37, 11064–11077.

3. Usachev, K.S. Filippov, A.V. Filippova, E.A. Antzutkin, O.N. Klochkov, V.V.(2013) Journal of Molecular Structure, 1049, 436-440.

THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF 1,3-BIS(ALKYL)-6-METHYLURACIL DERIVATIVES WITH 1,2,3-AND 1,2,4- TRIAZOLIUM MOIETIES IN ALKYL CHAINS

Strobykina A.S., Semenov V.E., Krylova E.S., Kulik N.V., Voloshina A.D.

IOPC KSC RAS, Kazan, Russia.

According to the World Health Organization, antibiotic resistance is a global problem nowadays and every year it is getting more and more rampant. Outbreaks of infections and their spread in everyday life are caused not only by microbial contamination of the environment, but also by acquired resistance of microorganisms to commonly used medicines. Strains of microorganisms circulating in the hospital environment are extremely virulent and have a wide range of aggressive factors. In addition, they're highly contagious and highly resistant to the action of known antibiotics and disinfectants.

In recent years chemotherapy combination of already known and new classes of antibiotics is widely used in order to prevent the development of drug resistance and the impact on sustainable microorganisms. In this regard, promising approaches to overcoming of microorganism's resistance to medicines are the synthesis of compounds belonging to known classes of antibiotics, and search of entirely new groups of antimicrobial agents.

Previously it was shown that 1,3-bis(alkyl)-6-methyluracil derivatives with 1,2,3-and 1,2,4- triazolium moieties have a wide range of antimicrobial activity, antitumor activity and exhibit moderate toxicity in experiments on laboratory animals [1].

Screening of new 1,3-bis(alkyl)-6-methyluracil derivatives with 1,2,3-and 1,2,4- triazolium moieties in alkyl chains on the antimicrobial activity has allowed to identify the compounds that are superior in its characteristics to the popular

antibiotics. Bacteriostatic and fungistatic properties as well as bactericidal and fungicidal activity were determined by the method described by us earlier [2].

Minimal Inhibitory Concentration of the leader compounds for the Gram-positive bacteria is 0.4-4.0 mg/l and for the Gram-negative bacteria - 8.0-31.3 mg/l. Antifungal activity of the investigated drugs in concentrations of 0.8-4.0 mg/l was shown.

To study the toxic effect of the compounds on normal cells WST-test was used. This is analogue of the MTT-test with a water-soluble formazan salts. It was shown that 1,3-bis(alkyl)-6-methyluracil derivatives with 1,2,3- and 1,2,4- triazolium moieties in alkyl chains exhibit low cytotoxicity to hepatocytes and cells line WI-38.

Study of antitumor effect using the multifunctional system Cytell Cell Imaging according to standard protocols for cell lines MCF-7 (breast cancer) was carried out. Most of the studied compounds showed antitumor activity at a concentration of $1 \cdot 10^{-4}$ M.

The results of this work shown that the investigated compounds can be considered as potential antimicrobial agents and used as key components for new drugs.

The work is financial supported by Russian Scientific Foundation (project No. 14-50-00014).

References:

1 Voloshina A.D. Semenov V.E. Strobykina A.S. Kulik N.V. Krylova E.S. Zobov V.V. Reznik V.C. Synthesis, antimicrobial and toxicity properties of novel derivatives of 1,3-bis(alkyl)-6-methyluracil with 1,2,3- and 1,2,4-triazolium moieties // *Bioorganic chemistry*. -2017. –Vol.43. -№2. – P.197-204.

2 Tatarinov D.A. Kuznetsov D.M. Voloshina A.D. Lyubina A.P. Strobykina A.S. Mukhitova F.K. Polyancev F.M. Mironov V.F. Synthesis of 2-(2-hydroxyaryl) alkenylphosphonium salts from phosphine oxides via ring-closing ring-opening approach and their antimicrobial evaluation. // *Tetrahedron*. -2016. -Vol. 72. – P. 8493–8501.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 1,3-БИС(АЛКИЛ)-6-МЕТИЛУРАЦИЛОВ, СОДЕРЖАЩИХ 1,2,3- И 1,2,4-ТРИАЗОЛИЕВЫЕ ФРАГМЕНТЫ В АЛКИЛЬНЫХ ЦЕПОЧКАХ

Стробыкина А.С., Семенов В.Э., Крылова Е.С.,
Кулик Н.В., Волошина А.Д.

ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия.

По данным Всемирной организации здравоохранения, устойчивость к антибиотикам на сегодняшний день является глобальной проблемой, с каждым годом приобретая все более угрожающие масштабы. Причиной всплеск инфекций и их распространение в быту является не только микробная загрязненность окружающей среды, но и приобретенная микроорганизмами устойчивость к применяемым препаратам. Штаммы микроорганизмов, циркулирующие во внутрибольничной среде, являются чрезвычайно вирулентными и обладают широким набором факторов агрессивности. Кроме того, они высоко контагиозные и высокоустойчивы к действию известных антибиотиков и дезинфектантов.

В последнее время для предотвращения развития лекарственной резистентности и воздействия на устойчивую микрофлору все чаще используют комбинированную химиотерапию из уже известных и новых классов антибиотиков. В связи с этим перспективными подходами в преодолении устойчивости микроорганизмов к лекарствам являются синтез соединений, относящихся к известным классам антибиотиков, а также поиск принципиально новых групп антимикробных препаратов.

Ранее показано, что 1,3-Бис(алкил)-6-метилурацилы, содержащие 1,2,3- и 1,2,4-триазолиевые фрагменты обладают широким спектром антимикробной активности, противоопухолевым действием и проявляют умеренную токсичность в опытах на лабораторных животных [1].

Скрининг новых 1,3-Бис(алкил)-6-метилурацилов, содержащих 1,2,3- и 1,2,4-триазолиевые фрагменты в алкильных цепочках, на антимикробную активность позволил выделить соединения, превосходящие по своим показателям известные антибиотики. Бактериостатические и фунгистатические свойства а также бактерицидную и фунгицидную активности определяли методом, описанным нами ранее [2].

Минимальные ингибирующие концентрации соединений лидеров по отношению к грамположительным бактериям составляют 0.4-4.0 мг/л, в отношении грамотрицательных бактерии - 8.0-31.3 мг/л. Противогрибковая активность исследуемых препаратов проявляется в концентрациях 0.8-4.0 мг/л.

В ходе экспериментов было выявлено, что основными структурными факторами, определяющими антимикробную активность, являются расстояние между урациловым и триазолиевым фрагментами, а также природа алкильных радикалов при триазолиевых фрагментах.

Для исследования токсического эффекта соединений на нормальные клетки был использован WST-тест - аналог МТТ-теста с водорастворимыми солями формазана. Было показано, что 1,3-Бис(алкил)-6-метилурацилы, содержащие 1,2,3- и 1,2,4-триазолиевые фрагменты в алкильных цепочках, проявляют низкую цитотоксичность на гепатоцитах и клетках эмбриона легкого человека WI-38.

Изучение противоопухолевого действия проводили с использованием многофункциональной системы Cytell Cell Imaging по стандартным протоколам на клеточной линии MCF-7 (рак молочной железы). Большинство исследованных соединений в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М показали противоопухолевую активность.

В результате проделанной работы установлено, что исследованные соединения могут рассматриваться как потенциальные антимикробные агенты и привлекаться в качестве основных компонентов для создания лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00014).

Литература:

1 Волошина А. Д, Семенов В. Э. Стробыкина А. С. Кулик Н. В. Крылова Е. С. Зобов В. В. Резник В. С. Синтез, антимикробные и токсические свойства новых производных 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила, содержащих 1,2,3- и 1,2,4-триазолиевые фрагменты // Биоорганическая химия. -2017. -Т. 43. - № 2. - С. 197–204.

2 Tatarinov D.A. Kuznetsov D.M. Voloshina A.D. Lyubina A.P. Strobykina A.S. Mukhitova F.K. Polyancev F.M. Mironov V.F. Synthesis of 2-(2-hydroxyaryl) alkenylphosphonium salts from phosphine oxides via ring-closing ring-opening approach and their antimicrobial evaluation. // Tetrahedron. -2016. -Vol. 72. – P. 8493–8501.

GENERATION OF PLASMID DNA EXPRESSING SPECIES-SPECIFIC HORSE VEGF164 AND FGF2 FACTORS FOR GENE THERAPY, AND CLINICAL APPLICATION FOR DIRECT GENE THERAPY FOR THE TREATMENT OF EQUINE TENDINITIS AND DESMITIS

Litvin Y.A.¹, Kovac M.², Aliev R.O.², Zakirova E.Yu.¹,
Zhuravleva M.N.¹, Kiyasov A.P.¹, Rizvanov A.A.¹

¹ - Kazan Federal University, Kazan, Russia.

² - Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology,
Moscow, Russia

In this study, we have generated a dual expression cassette plasmid DNA (pDNA) construct containing the species-specific horse (*Equus caballus*) codon optimized sequences encoding potent pro-angiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF164) and basic fibroblast growth factor (FGF2) under the strong eukaryotic promoters (EF-1 α and CMV promoters, respectively).

pDNA construct was designed on the basis of pBudCE4.1 vector (Invitrogen, USA), it is a high copy number plasmid with two independent expression cassettes under the control of two different eukaryotic promoters: CMV and EF-1 α , each with its own MCS. Original plasmid pBudCE4.1 vector contains the ZeocinTM (ThermoFisher Scientific, USA) resistance gene under the hybrid eukaryotic/prokaryotic promoter SV40/EM7. It allows the selection of both eukaryotic and prokaryotic cells containing pDNA. However, SV40/EM7 promoter is not suitable for pDNA vector use in gene therapy, because it will result in expression of ZeocinTM resistance gene in the cells of the gene therapy treated organism. That is why we replaced the ZeocinTM resistance gene with its promoter were excised and replaced with a sequence of kanamycin resistance gene with its promoter, which were taken from pDONR221 by PCR amplification using specific primers and cloned into pBudCE4.1 by ordinary PCR-cloning protocol by sites MluI–NheI restriction enzymes. By these actions we created pBUDK vector.

A starting coding sequences of horse vegf164 (NCBI Reference Sequence: NM_001081821.1) and fgf2 (NCBI Reference Sequence: NM_001195221.1) were codon optimized using algorithm «OptimumGene» (GenScript, USA), synthesized de novo, and cloned into pUC57 (GenScript, USA). From pUC57 codon optimized coding sequence of VEGF164 then was cut by the restriction enzymes NotI and XbaI and cloned into pBUDK vector under EF-1 α promoter into multiple cloning site (MCS). Coding sequence of FGF2 from pUC57 was cut out by the restriction enzymes HindIII and XmaI and cloned into pBUDK vector under CMV promoter.

For clinical application for direct gene therapy in horses we the first time successful used the direct gene therapy for restoration severe injuries of the suspensory ligament branch and superficial digital flexor tendon. We injected at the site of injury in the suspensory ligament branch and tendon the pBUDK-ecVEGF164-ecFGF2 which simultaneously expresses VEGF164 and FGF2 factors. Effect of treatment was assessed using clinical observation and ultrasound imaging in a period

of a few months. We showed, after using gene therapy, in the period of 2-3 months of the injury complete recovery of function and full restoration severe damaged tissue suspensory ligament and superficial digital flexor tendon.

СОЗДАНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ВИДОСПЕЦИФИЧНЫЕ ДЛЯ ЛОШАДИ ФАКТОРЫ VEGF164 И FGF2

Литвин Я.А., Закирова Е.Ю., Журавлева М.Н., Ризванов А.А.

ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

ВВЕДЕНИЕ В данном исследовании мы создали двухкассетную плазмидную ДНК (пДНК), как генетическую конструкцию, имеющую кодон оптимизированные кодирующие последовательности видоспецифичных для лошади (*Equus caballus*) белковых факторов: фактора роста эндотелия сосудов (VEGF164) и основного фактора роста фибробластов (FGF2). Данные кодирующие последовательности факторов находятся под эукариотическими промоторами (EF-1 α и CMV соответственно). Мы продемонстрировали эффективную экспрессию этих рекомбинантных белков *in vitro* на клетках HEK293FT после их трансфекции, через 48 часов.

Полученная пДНК подходит для применения в генной терапии в живом организме лошади, и соответствует правилам FDA и другим рекомендациям международных регуляторов в сфере лекарственных средств.

Ключевые слова: плазмидная ДНК, генная терапия, лошадь, сосудистый эндотелиальный фактор роста 164, фактор роста фибробластов 2.

МЕТОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ В последние годы в Республике Татарстан активно возрождается конный спорт. Травма конечности или дегенеративное заболевание суставно-связочного аппарата у скаковой лошади часто приводит к длительному или окончательному выбыванию из соревновательного процесса, что сопряжено с большими убытками. Существует проблема недостаточной эффективности существующих методов лечения повреждений опорно-двигательного аппарата [1]. Перспективным представляется генно-терапевтический подход [2].

На основе модифицированной векторной плазмиды pBudCE4.1 (Invitrogen, США), в которой последовательность гена устойчивости к зеоцину и его промотор заменены на ген устойчивости к канамицину, нами была получена плазмидная ДНК конструкция, содержащая кодон-оптимизированные последовательности *veg164* и *fgf2*, видоспецифичные для лошади. VEGF164 и FGF2 обладают выраженным проангиогенным и пролиферативным эффектом. Идентичность полученной конструкции pBUDKan-ecVEGF164-ecFGF2 была подтверждена методом секвенирования и рестрикционным анализом с последующим электрофорезом в агарозном геле полученных рестрикционных фрагментов. Иммунофлуоресцентный анализ и иммуноблоттинг подтвердил

одновременную ко-экспрессию рекомбинатных белков FGF2 и VEGF164 в трансфицированных клетках HEK293FT. Полученная нами конструкция соответствует требованиям FDA для генно-терапевтических препаратов для клинического применения [3].

Таким образом, созданная нами плазмидная конструкция потенциально может быть использована в генной терапии травм и заболеваний опорно-двигательного аппарата лошадей, что позволит снизить убытки в сфере профессионального спорта.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Ковас, Регенеративная медицина в лечении ортопедических заболеваний лошадей. Конный мир, 3, 2012.
2. С.Н. Evans, S.C. Ghivizzani, P.D. Robbins, Orthopedic gene therapy in 2008. Mol Ther, Feb, (2009) 17(2):231-44.
3. Y.A. Litvin, E. Zakirova, M. Zhuravleva, A. Rizvanov, Generation of plasmid DNA expressing species-specific Horse VEGF164 and FGF2 factors for gene therapy, BioNanoScience (2016) doi:10.1007/s12668-016-0273-2

ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF NOVEL 5(S)-MENTHYLOXY DERIVATIVES OF 2(5H)-FURANONE

Cong H.H., Sibgatullina R.R., Khabibrakhmanova A.M.,
Kurbangalieva A.R., Ziganshina L.E.

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

The search for alternative strategies of pharmacological regulation of inflammation has been acquiring more and more attention recently. We developed the methodology for the first stage of screening for the anti-inflammatory activity of novel compounds – pre-screening methodology, comprising simple *in vitro* test-systems, which include: osmotic and free radical hemolysis of human erythrocytes, and a test for inhibition of platelet aggregation induced by 1 mM arachidonic acid. We implemented pre-screening of six novel derivatives of 2(5H)-furanone, containing (*l*)-menthol fragment (compounds R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, и R₆ – 5(S)-menthyloxy derivatives of 2(5H)-furanone), selected the most active compound and tested it for anti-inflammatory activity on the model of carrageenan-induced mice paw edema.

Data obtained were analyzed using Microsoft Office Excel 2010. The Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk criteria were used to estimate the normality of the distribution using SPSS. Statistical analysis was performed using Student's t-test. P-values less than 0,05 were considered statistically significant.

RESULTS: (*l*)-Menthol protected red blood cells from the damaging effects of hypotonic environment, reducing the intensity of osmotic hemolysis at concentrations of 10⁻⁵ M and 10⁻⁴ M. At a of concentration 10⁻³ M (*l*)-menthol enhanced the damaging effect of hypotonic medium on erythrocytes. Compounds R₁, R₂, R₃ and R₄

stimulated osmotic hemolysis. Compounds R₅ and R₆ showed membrane-stabilizing activity at various concentrations.

(*l*)-Menthol also showed the membrane-stabilizing effect, reducing the intensity of free radical hemolysis at concentrations of 10⁻⁸, 10⁻⁶, 10⁻⁴ M. Compounds R₁, R₂, R₄ and R₆ exhibited a membrane-damaging effect on the model of free radical hemolysis at all studied concentrations. Compound R₃ showed protective effect on red blood cells at low concentrations, while with the increase of concentrations it stimulated erythrocyte damage. Compound R₅ protected red blood cells at concentrations of 3·10⁻⁹ and 3·10⁻⁵ M.

(*l*)-Menthol inhibited arachidonic acid induce platelet aggregation at a concentration of 10⁻⁵ M. At a concentration of 10⁻⁸ M (*l*)-menthol enhanced platelet aggregation. Compounds R₁, R₂, R₄ enhanced platelet aggregation at various concentrations. Compound R₃ inhibited platelet aggregation at a concentration of 10⁻⁶ M, while at concentrations of 10⁻⁸ and 10⁻⁵ M this compound stimulated platelet aggregation. Compound R₅ did not affect the platelet aggregation. Compound R₆ exhibited the inhibitory effect on platelet aggregation at all studied concentrations, it demonstrated maximum efficacy in two of the three studied model cell test-systems.

On the basis of these results we selected the compound R₆ for further testing for anti-inflammatory activity on the model of carrageenan induced mice paw edema.

(*l*)-Menthol at the doses of 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg showed anti-inflammatory activity on the model of carrageenan induced mice paw edema.

The compound R₆ showed anti-inflammatory effects at all studied doses (68,3 mg/kg; 136,6 mg/kg and 273,3 mg/kg, equaling by the menthol content to the studied menthol doses) at different time-points of the experiment. At the doses of 136,6 mg/kg and 273,3 mg/kg, the anti-inflammatory effect of compound R₆ persisted for up to 5 days of observation.

The compound R₆ showed a more pronounced anti-inflammatory effect compared to menthol at some time-points of the experiment.

Conclusions:

1. A new derivative of 2(5*H*)-furanone containing *l*-menthol fragment, the compound R₆, exhibited a membrane-stabilizing effect on the osmotic hemolysis model, an inhibitory effect on arachidonate-induced platelet aggregation, and pronounced anti-inflammatory activity.

2. *In vitro* model cell-systems (osmotic hemolysis and platelet aggregation) can be used for the pre-screening for new potential anti-inflammatory agents.

Acknowledgments: This work was supported by Russian government program of competitive growth of Kazan Federal University.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ 5(S)-МЕНТИЛОКСИПРОИЗВОДНЫХ 2(5H)-ФУРАНОНА

Конг Х.Х., Сибгатуллина Р.Р., Хабибрахманова А.М., Курбангалиева А.Р.,
Зиганшина Л.Е.

ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

В настоящее время актуальным является поиск альтернативных подходов к фармакологической регуляции воспаления. В качестве методов для первого этапа скрининга на противовоспалительную активность новых соединений мы использовали простые *in vitro* тест-системы, в которые входят: осмотический и свободнорадикальный гемолиз эритроцитов, тест на способность ингибирования агрегации тромбоцитов, индуцированной 1мМ арахидоновой кислотой. Таким образом мы провели скрининг 6 новых производных 2(5H)-фуранона, содержащих фрагмент (l)-ментола (соединения R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, и R₆ - 5(S)-ментилоксипроизводных 2(5H)-фуранона), отобрали наиболее перспективное соединение, противовоспалительную активность которого оценили на модели каррагенинового отека лап мышей в сравнении с эталонным соединением – (l)-менолом.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 2010. Использовали критерий Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка для оценки нормальности распределения с помощью программы SPSS. Для оценки достоверности различий выборок применяли параметрический t-критерий Стьюдента. За достоверное принимали различие при уровне вероятности 95 % и более ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ:

(l)-Ментол оказал защитное действие на мембраны эритроцитов, снижая осмотический гемолиз в концентрациях 10^{-5} М и 10^{-4} М. В концентрации 10^{-3} М он обладал повреждающим эффектом. Соединения R₁, R₂, R₃ и R₄ усиливали осмотический гемолиз. Соединения R₅, R₆ проявляли мембраностабилизирующее действие в различных концентрациях.

(l)-Ментол также проявлял мембраностабилизирующий эффект в виде снижения интенсивности свободнорадикального гемолиза в концентрациях 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} М. Соединения R₁, R₂, R₄ и R₆ проявляли мембраноповреждающее действие на модели свободно-радикального гемолиза во всех исследованных концентрациях. Соединение R₃ проявляло защитный эффект в низких концентрациях, но с увеличением концентрации способствовало повреждению мембран эритроцитов. Соединение R₅ защищало эритроциты от действия свободных радикалов в концентрациях: $3 \cdot 10^{-9}$ и $3 \cdot 10^{-5}$ М.

(l)-Ментол ингибировал агрегацию человеческих тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой, в концентрации 10^{-5} М. В концентрации 10^{-8} М он усиливал агрегацию тромбоцитов. Соединения R₁, R₂, R₄ усиливали агрегацию тромбоцитов в различных концентрациях. Соединение R₃

ингибировало агрегацию тромбоцитов в концентрации 10^{-6} М, в концентрациях 10^{-8} и 10^{-5} М оно усиливало агрегацию тромбоцитов. Соединение R₅ не влияло на агрегацию тромбоцитов. Соединение R₆ проявляло ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов во всех исследованных концентрациях.

На основании полученных результатов мы выбрали соединение R₆ для изучения противовоспалительной активности на модели каррагенинового отека лап мышей, так как по двум из трех критериев оценки оно проявило наибольший эффект.

При моделировании каррагенинового отека лап мышей мы наблюдали противовоспалительную активность (*l*-ментола в дозах 25 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг.

Соединение R₆ также проявило противовоспалительный эффект во всех исследованных дозах (68,3 мг/кг; 136,6 мг/кг и 273,3 мг/кг), соответствующих по содержанию ментола изученным дозам ментола, на разных сроках исследования. Противовоспалительное действие соединения R₆ в дозах 136,6 мг/кг и 273,3 мг/кг сохранялось до 5-ти дней наблюдения. Соединение R₆ проявило более выраженный противовоспалительный эффект по сравнению с ментолом в некоторые сроки наблюдения.

ВЫВОДЫ:

1. Новое производное 2(5*H*)-фуранона, содержащее фрагмент *l*-ментола – соединение R₆, проявляло мембраностабилизирующее действие на модели осмотического гемолиз, ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов и противовоспалительную активность.

2. Клеточные модельные тест-системы (осмотический гемолиз и агрегация тромбоцитов, стимулированная арахидоновой кислотой) могут быть использованы для первого этапа скрининга новых потенциальных противовоспалительных веществ.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК МИНЕРАЛОМ ГАЛЛУАЗИТОМ НА ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

Рожина Э.В., Фахруллин Р.Ф.

ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Известно, что и микробные клетки, и бактерии имеют на своей поверхности защитный каркас [1], который защищает их от условий окружающей среды. Клетки млекопитающих не имеют надежной внешней стенки, а защищены только мембраной из двойного липидного слоя, которая

является весьма восприимчивой к изменениям условий. Отметим, что механическая непрочность клеток млекопитающих значительно усложняет возможности химического воздействия на клетку, поэтому многие исследования лекарств *in vitro* невозможны или требуют долговременных и дорогостоящих процессов, которые направлены на сохранение жизнеспособности клетки [2]. Создание цитопротекторного каркаса на поверхности клеток млекопитающих из долговечных материалов перспективно для использования в различных тест-системах, клеточной терапии, восстановительной медицине, а также для фундаментальных исследований в области клеточной биологии. В литературе отсутствуют работы по созданию каркасов для клеток млекопитающих с применением нанотрубок минерала галлуазита. Галлуазит является легкодоступным природным материалом и имеет особое значение для наномедицины и фармацевтики, поскольку способен связывать различные препараты внутри канальцев или на поверхности и удерживать их, увеличивая стабильность препарата или меняя скорость его освобождения [3]. Полиэлектролиты нередко используются в работах по инженерии поверхности клетки для создания равномерного покрытия и надежного закрепления наноматериалов [4]. Целью данного исследования было выяснение влияния модификации внешней поверхности клеток аденокарциномы легких человека (A549) полиэлектролитами и нанотрубками галлуазита в различных концентрациях на пролиферативную активность и жизнеспособность последних. Проводилось сравнение модификации клеток полиэлектролитами poly(acrylamide-co-diallyldimethyl-ammonium chloride) solution 10 wt% in H₂O (P(AAm-co-DADMAC)); poly(allylamine hydrochloride) PАН Mw 70 kDa; poly(ethyleneimine) solution 50 wt% in H₂O (PEI); poly(diallyldimethylammonium chloride) solution 35 wt% in H₂O (PDADMAC average Mw < 100,000 (very low molecular weight)) все исследуемые полиэлектролиты получены из компании Sigma-aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Было протестировано три концентрации минерала галлуазита 2.5, 5 и 10 мкг на 100 тыс.клеток. Жизнеспособность клеток млекопитающих оценивалась с помощью мтт-теста (данные не приведены) и с использованием лазерной конфокальной микроскопии. В соответствии с поставленными задачами с помощью колориметрических тестов оценивалась жизнеспособность клеток с каркасом из полиэлектролита и нанотрубок галлуазита непосредственно после формирования каркаса и через 24 часа.

Полученные результаты указывают на незначительное влияние всех исследуемых концентраций нанотрубок галлуазита на пролиферативную и дыхательную активность клеток. Таким образом, функционализация поверхности клеток нанокаркасом может быть использована для защиты последних от летальных факторов, а также для направленной доставки лекарств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-00196).

Список литературы:

1. Xiong W. et al. (2013) Chem. Commun. 49, 7525-7.

2. Yang S.H. et al. (2013) *Small*, 9, 178-186.
3. Рожина Э.В. и др. (2014) *Гены и клетки*, IX(3), 25-28.
4. Yang S.H. et al. (2009) *Small*, 5(17), 1947-51.

METHOD OF MEDICAL IMPLANTS POLLUTION ASSESSMENT USING ATOMIC FORCE MICROSCOPE

Akhatova F.S., Kibardina M.L., Trizna E.Y., Kayumov A.R., Fakhrullin R.F.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Currently, insufficient number of the surface of medical catheters and implants studies, in particular for their contamination by microorganisms is the actual problem. Once they are installed in the human body, different organics and cells immediately attach on their surface. As for the most common organic contaminants, for example, microorganisms, there is currently no research describing how they affect the integration and adhesion.

Atomic force microscopy is one of the newest methods of the surface morphology and its mechanical properties studying. This method has opened wide opportunities for a comprehensive study of morphology and various characteristics of the surface. Using the atomic force microscope the studies can be carried out in a wide range of temperatures, in a vacuum, in various media, including liquid media. This circumstance opens the possibility to completely study different objects from polymers, films, materials to living objects. A great advantage for biological samples is the possibility of studying in a live form. Also, atomic force microscopy allows not only to obtain the topography of the surface, but also to obtain statistical values of various surface characteristics, such as elasticity, adhesion, roughness, and others. Thus, we can check how these or other conditions affect the amount of microorganisms attached to the surface, and also create methods to prevent bacterial adhesion. Obtaining and interpreting data of different mechanical characteristics will help to develop quality standards for these product groups.

The goal is to develop a rapid and reliable method for assessing the contamination of medical catheters and implants.

During the analysis, it was noted that there are quite a lot of methods for studying microorganisms. This is light, and various types of electron microscopy, as well as methods of microbiological crops. However, most of them require complex sample preparation and special conditions (for example, vacuum) for study. Thus, research requires long time costs, special skills and experience, as well as expensive reagents.

Atomic force microscopy facilitates the process of this problem studying. This is a fairly quick way to obtain qualitative and quantitative characteristics of the studied objects. Atomic force microscope allows to obtain 3D images of the surface ultrastructure with molecular resolution in real time and physiological conditions. This method can also be used to study various physiological processes, in particular

for the study of morphological changes of the microorganisms under the effect of substances such as antibiotics.

We conducted a comparative analysis of some groups of microorganisms: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Microorganisms were grown in standard conditions. Fixation was performed with 1% glutaraldehyde for 8 hours. Data obtained with an atomic force microscope Dimension Icon and Dimension FastScan (Bruker, USA) operating in PeakForce Tapping mode. The obtained data were processed using the software Nanoscope Analysis V. 1.7. (Bruker).

Morphological characteristics of each species of microorganisms were studied in details. A number of surfaces with different adhesive properties were analyzed. The specificity of the formation of biofilms on these surfaces was studied. Also polymicrobial biofilm consisting of two or more kinds was examined. The survival of certain species in the polymicrobial community was shown. Data on the topography of the surface and some mechanical properties of biofilm such as elasticity, adhesion and roughness were obtained.

During the analysis we have noted that using atomic force microscopy we can get a better performance about these objects. This method allowed us to obtain 3D images with high resolution, as well as to quantify the statistical values of the essential parameters of the surface structure.

МЕТОД ОЦЕНКИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИМПЛАНТАТОВ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Ахатова Ф.С., Кибардина М.Л., Тризна Е.Ю.,
Каюмов А.Р., Фахруллин Р.Ф.

ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

В настоящее время актуальной проблемой является недостаточное количество исследований поверхности медицинских катетеров и имплантатов, в частности на предмет их загрязнения микроорганизмами. Как только они установлены в организм человека, на их поверхность сразу же попадают и прикрепляются различная органика и клетки. Что касается наиболее распространенных органических загрязнений, например, микроорганизмов, то в настоящее время нет исследований на тему, как они влияют на интеграцию и адгезию.

Атомно-силовая микроскопия является одним из новейших методов исследования морфологии поверхности и ее механических свойств. Данный метод открыл широкие возможности для комплексного изучения морфологии и различных характеристик поверхности. С помощью атомно-силового микроскопа исследования можно проводить в широком диапазоне температур, в вакууме, в различных средах, в том числе жидких. Это дает возможность для изучения совершенно разных объектов от полимеров, пленок, материалов до

живых объектов. Большим преимуществом для биологических образцов является возможность исследования в нефиксированном состоянии. Также атомно-силовая микроскопия позволяет не только получить топографию поверхности, но и получить статистические значения различных характеристик поверхности, таких как упругость, адгезию, шероховатость и другие. Таким образом, мы можем проверить, как влияют те или иные условия на то, насколько сильно микроорганизмы прикрепляются к поверхности, а также создать методы предотвращения бактериальной адгезии. Получение и интерпретация данных различных механических характеристик поможет разработать стандарты оценки качества для данных групп изделий.

Целью является разработка быстрого и достоверного метода оценки загрязненности медицинских катетеров и имплантатов.

В ходе анализа было отмечено, что существует достаточно много методов исследования микроорганизмов. Это и световая, и различные типы электронной микроскопии, а также методы микробиологических посевов. Однако большинство из них требуют для изучения сложную пробоподготовку и особые условия (например, вакуума). Тем самым для проведения исследований необходимы длительные временные затраты, специальные навыки и опыт, а также дорогостоящие реактивы.

Процесс изучения данной проблемы облегчает атомно-силовая микроскопия. Это достаточно быстрый способ получения качественных и количественных характеристик исследуемых объектов. Атомно-силовой микроскоп позволяет получить 3D изображения поверхностных ультраструктур с молекулярным разрешением в режиме реального времени и физиологических условиях. Данный метод также может быть использован для изучения различных физиологических процессов, в частности для исследования морфологических изменений микроорганизмов под действием веществ, например, антибиотиков.

Мы провели сравнительный анализ некоторых групп микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*. Микроорганизмы были выращены в стандартных условиях. Фиксация производилась при помощи 1% глутарового альдегида в течении 8 часов. Данные получены на атомно-силовом микроскопе Dimension FastScan и Dimension Icon (Bruker, США), работающих в режиме PeakForce Tapping. Полученные данные были обработаны с использованием программного обеспечения Nanoscope Analysis v.1.7. (Bruker).

Детально были изучены морфологические особенности каждого вида микроорганизмов. Проанализировано ряд поверхностей с различными адгезивными свойствами. Изучена специфика образования биопленок на данных поверхностях. Также были изучены полимикробные биопленки, состоящие из двух и более видов. Показано выживание определенных видов в полимикробных сообществе. Были получены данные по топографии поверхности и ряд механических характеристик биопленок, таких как упругость, адгезию и шероховатость.

В ходе проведенного анализа нами отмечено, что с помощью атомно-силовой микроскопии можно получить более полное представление об этих

объектах. Данный метод позволил получить 3D изображения с высоким разрешением, а также измерить количественно статистические значения важных параметров поверхностной структуры.

BIOPOLIMERIC NANOSTRUCTURED COMPOSITES IN REGENERATION OF BONE DEFECTS

Naumenko E.A., Guryanov I.D., Zakirova E.Yu., Fakhrullin R.F.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Bone is a solid state tissue, which contains about 30% matrix, 60% minerals and 10% water. The main component of bone organic matrix is collagen which responsible for the tensile strength whereas mineral component (calcium phosphate) imparts compressive strength to the bone tissue. Despite its relative strength bone tissue is susceptible to fracture as a result of trauma, pathological fragility due to deficiency of organic matrix and resorption. Clinically using devices for the bone fixation and repair are mostly fabricated from metals (stainless steel, titanium and its alloys). Metallic devices and implants due to their non- biodegradable nature often require an additional surgery in order to remove these from the body, can promote the allergic reactions, infections and other complications. Biodegradable biopolymers are one of the primary and common biomaterials used in tissue engineering including bone regeneration due to their high level of biodegradability and controlled degradation rates that makes these materials highly beneficial for clinical applications. Moreover the degradation and mechanical properties of polymeric materials can be altered by changing their structural composition and fabrication techniques as well as adding of biocompatible nanomaterials. Osseous wound healing involves the recruitment of mesenchymal stem cells to perform the molecular tasks of bone regeneration.

In presented work we focused on a combination of three biopolymers of different nature, chitosan, agarose, and gelatine, as the materials to produce porous tissue engineering scaffolds for veterinary practice. This biopolymer composition was doped with natural nanofiller (halloysite nanotubes) to enhance both the biological compatibility and the mechanical properties of scaffolds. The surface irregularities of the scaffolds pores due to the insoluble nanotubes promoted the best adhesion of the cells on scaffolds materials. Moreover they increased the composites' strength. We applied nanostructured and pure biopolymer matrices with allogenic adipose derived stem cells (ADSC) for the restoration of bone defects in dogs in the frames of two clinical cases of bone deformation due to fractures of limbs. In general, the use of biopolymer matrices in combination with stem cells promoted normal regeneration of bone tissue even in case of complicated fractures with incorrect primary fusion of bones. In addition, there were no manifestations of the rejection reaction and dramatic changes in clinical blood tests. Bones of the animal with prone of allergic reaction to metals were regenerated more efficiently after the removal of metal

constructs. However, no inflammatory reaction was observed with respect to the biopolymer matrix and allogenic ADSC. So, the combination of traditional surgery using metallic constructions with implantation of 3D-biopolymeric matrices doped with nanomaterials can be effective in the veterinary practice for bone regeneration.

The work is performed according to the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University and was partially financed by RFBR grant № 15-04-99660.

БИОПОЛИМЕРНЫЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ КОМПОЗИТЫ В ВОСТАНОВЛЕНИИ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ

Науменко Е.А., Гурьянов И.Д.,
Закирова Е.Ю., Фахруллин Р.Ф.

ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Кость представляет собой твердотельную ткань, которая содержит около 30% матрикса, 60% минералов и 10% воды. Основным компонентом костной органической матрицы является коллаген, который отвечает за прочность на растяжение, тогда как минеральный компонент (фосфат кальция) придает костной ткани прочность на сжатие. Несмотря на свою относительную прочность кость восприимчива к переломам в результате травмы, патологической хрупкости из-за дефицита органической матрицы и резорбции. Клинически использование устройств для фиксации и восстановления кости в основном производится из металлов (нержавеющей стали, титана и его сплавов). Металлические устройства и имплантаты из-за их небиоразлагаемой природы часто требуют дополнительной операции, чтобы удалить их из организма, могут способствовать аллергическим реакциям, инфекциям и другим осложнениям. Биоразлагаемые биополимеры являются одним из основных и общих биоматериалов, используемых в тканевой инженерии, включая регенерацию костей из-за их высокого уровня биоразлагаемости и возможности контроля скорости деградации, что делает эти материалы применимыми для клинических применений. Кроме того, деградация и механические свойства полимерных материалов могут контролироваться путем изменения их структурного состава и технологии изготовления, а также добавления биосовместимых наноматериалов. Восстановление костного дефекта включает в себя привлечение мезенхимальных стволовых клеток для выполнения молекулярных задач регенерации кости.

В представленной работе мы изучили пригодность комбинации трех биополимеров различной природы, хитозана, агарозы и желатина в качестве материала для производства пористых тканевых инженерных носителей для ветеринарной практики. Эта биополимерная композиция была допирована природным нанопополнителем (галлуазитные нанотрубки) для повышения как биологической совместимости, так и механических свойств строительных

лесов. Поверхностные неровности пор каркаса из-за нерастворимых нанотрубок способствовали лучшей адгезии клеток. Кроме того, нанотрубки увеличивали прочность композитов. Мы применили наноструктурированные и чистые биополимерные матрицы с аллогенными стволовыми клетками для восстановления костных дефектов у собак в рамках двух клинических случаев деформации кости из-за переломов конечностей. В целом использование биополимерных матриц в сочетании со стволовыми клетками способствовало нормальной регенерации костной ткани даже в случае сложных переломов с неправильным первичным срастанием костей. Кроме того, не было выявлено никаких проявлений реакции отторжения и резких изменений в клинических анализах крови. Кости животного со склонностью к аллергической реакции на металлы регенерировались более эффективно после удаления металлических конструкций. Однако не наблюдалось воспалительной реакции в отношении биополимерной матрицы и аллогенных стволовых клеток. Таким образом, сочетание традиционной хирургии с использованием металлических конструкций с имплантацией 3D-биополимерных матриц, допированных наноматериалами, может быть эффективным при использовании в ветеринарной практике для регенерации кости.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров и частично финансирована за счет средств гранта РФФИ № 15-04-99660.

HORIZONTAL GENE EXCHANGE IN THE GUT

Lerner A.^{1,2}, Aminov R.³, Matthias T.²

¹ B. Rappaport School of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology,
Haifa, Israel

² AESKU.KIPP Institute, Wendelsheim, Germany

³ School of Medicine & Dentistry, University of Aberdeen,
Aberdeen, United Kingdom

Key words: probiotics, microbiome, dysbiome, horizontal gene transfer, intestine, gut, biofilm, environment.

Abstract. Many essential functions of the human body are dependent on the symbiotic microbiota, which is present at especially high numbers and diversity in the gut. This intricate host-microbe relationship is a result of the long-term coevolution between the two. While the inheritance of mutational changes in the host evolution is almost exclusively vertical, the main mechanism of bacterial evolution is horizontal gene exchange. The gut conditions, with stable temperature, continuous food supply, constant physico-chemical conditions, extremely high concentration of microbial cells and phages, and plenty of opportunities for conjugation on the surfaces of food particles and host tissues, represent one of the most favorable ecological niches for horizontal gene exchange. Thus, the gut microbial system genetically is very dynamic and may rapidly respond, at the genetic level, to the changes in their environment. This has been shown, for example, for antibiotic resistance genes, which are now widely disseminated within the gut microbiota. Besides the extensive antibiotic use, there are many other factors which may affect the gut microbiota, including life-style, therapy, diet, refined food, food additives, consumption of pre- and probiotics, and many others. The impact of the changing selective pressures on gut microbiota, however, is poorly understood. Presumably the gut microbiome responds to these changes by genetic restructuring of gut populations, driven mainly via horizontal gene exchange. Thus, our main goal is to reveal the role played by horizontal gene exchange in the changing landscape of the gastrointestinal microbiome.

1. Aminov, R. I. 2011. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 2:158. doi: 10.3389/fmicb.2011.00158.

2. Aminov R. I. 2012. The extent and regulation of lateral gene transfer in natural microbial ecosystems. In: *Horizontal Gene Transfer in Microorganisms* (Ed: M.P. Francino), Chapter 6. Horizon Scientific Press, Norwich NR9 3DB, UK.

METCHNIKOFF, PROBIOTICS AND HORIZONTAL GENE EXCHANGE: THE NEED FOR CONTINUOUS REFINEMENT

Lerner A.^{1,3}, Aminov R.², Matthias T.³

1 B. Rappaport School of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology,
Haifa, Israel

2 School of Medicine & Dentistry, University of Aberdeen,
Aberdeen, United Kingdom

3 AESKU.KIPP Institute, Wendelsheim, Germany

The initial idea of colonization of the gastrointestinal tract (GIT) by beneficial microorganisms belongs to Élie Metchnikoff, who noticed, more than a century ago, that the largest proportion of centenarians live in Bulgaria. He attributed this to the extensive consumption of milk fermentation products, in particular Bulgarian yogurt (кисело мляко in Bulgarian, sour milk). He developed a theory that aging is caused by toxic bacteria in the gut, and he encouraged the use of Bulgarian yogurt and its principal component, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, to prevent this toxicity (Metchnikoff, 1907). The theory of aging did not hold but the advocated use of lactic acid bacteria as agents beneficial for health has grown tremendously and, in fact, the global probiotics demand was worth USD 27.9 billion in 2011 and is expected to reach USD 44.9 billion in 2018 (Transparency Market Research, 2013).

The original definition of probiotics introduced by Daniel Lilly and Rosalie Stillwell (1965), however, had a different meaning than that of Metchnikoff's, and it has been applied to the protozoa, in particular to the growth promotion of *Tetrahymena pyriformis* in response to a factor produced by *Colpidium campylum*. Only at the later stages, through several refinements, the definition has been converged with the original idea of Metchnikoff, and the current definition of probiotics is "live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance" (Fuller, 1989).

Commonly used probiotics include mainly lactic acid bacteria, particularly lactobacilli, bifidobacteria, lactococci, and streptococci. Less commonly used are yeasts, bacilli, and non-pathogenic *Escherichia coli* strains. The majority of probiotics, therefore, are facultative anaerobes, and it is thought that their main effects are mediated through the production of lactate and other short chain fatty acids that may inhibit the pathogens and affect the composition of gut microbiota, modulation of the immune system, and other favourable effects exerted by probiotics.

Probiotics usually have the GRAS (Generally Considered As Safe) status, but not all aspects of safety are presently properly evaluated. Among these are the potential of probiotics to contribute to horizontal gene transfer (HGT), which is a major driving force in bacterial evolution (Aminov, 2011; Aminov, 2012). HGT processes are especially pronounced in the GIT, with a number of factors contributing to the high frequency of HGT in the GIT. In the light of this, ingestion of probiotics may bring an additional gene pool to penetrate the gut microbiome, which may become an integral part of the microbiome gene pool. Some of these genes brought to

the gut microbiome by probiotics such as encoding antibiotic resistance are potentially harmful as providing pathogenic microbiota by the arsenal of antibiotic resistance genes, which may later result in therapy failure. Other potential culprits acquired via HGT are virulence genes. The borderline between the genes that are shared by probiotics and pathogens to interact with the host is very thin. Genes encoding adherence to the host mucin, for example, are considered to be a desirable trait for probiotics. But, at the same time, it is also important for the initial stages of colonization by pathogenic microbiota. In this presentation, we will discuss the potential safety issues associated with the ingestion of large quantities of probiotics, which may carry the mobilomes with the traits that are better to be avoided.

References

1. Aminov, R. I. 2011. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 2:158. doi: 10.3389/fmicb.2011.00158.
2. Aminov R.I. 2012. The extent and regulation of lateral gene transfer in natural microbial ecosystems. In: *Horizontal Gene Transfer in Microorganisms* (Ed: M.P. Francino), Chapter 6. Horizon Scientific Press, Norwich NR9 3DB, UK.
3. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365–378.
4. Lilly DM, Stillwell RH. 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147:747-748.
5. Metchnikoff, E. 1907. *Essais optimistes*. Paris. The prolongation of life. Optimistic studies. Translated and edited by P. Chalmers Mitchell. London: Heinemann, 1907.
6. Transparency Market Research. 2013. Probiotics Market (Dietary Supplements, Animal Feed, Foods & Beverages) - Global Industry Size, Share, Trends, Analysis, Growth And Forecast 2012 - 2018 (<http://www.transparencymarketresearch.com/probiotics-market.html>).

BACTERIAL TRANSLOCATION FROM THE GUT OF MICE C57BL/6 IN THE COURSE OF EXPERIMENTAL COLITIS

Khomyakova T.I.¹, Magomedova A.D.¹, Kozlovskaya G.V.¹,
Kozlovsky Yu.E.¹, Khomyakov Yu.N.²

1. Federal Government Budgetary Scientific Institution «SRI of Human Morphology», Moscow
2. Federal Government Agency of the Public Health Service
Antiplague Center, Moscow

Bacterial translocation is a usual process, constantly going on in the organism at an individually determined level in any system «host-microbiome». In the conditions of distress, inflammation, immune suppression or other pathology the permeability of the gut barriers grows. It leads to the increase of the translocation and enlarge bacterial loading in organs. The aim of the investigation was to estimate the

bacterial loading in organs at different time points in case of the DSS – induced colitis in mice C57Bl/6. At first, the consuming of 2% DSS solution induced moderated translocation that lead to compensated changes in a lamina propria and other protective reactions of the immune system. The bacterial loading at the mesenterial lymphatic node increased, but in those conditions, the loading of all other organs was not higher than in the control group. More strong or more prolonged experimental exposure leads to the intensive inflammation and dysregulation of the gut barrier. As a result, the hypertranslocation leads to the development of the extraintestinal manifestations of the colitis.

Key words: bacterial translocation, hypertranslocation, DSS-colitis, inflammation, mice.

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТРАНСЛОКАЦИЯ ИЗ ТОЛСТОЙ КИШКИ МЫШЕЙ C57BL/6 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ

Хомякова Т.И.¹, Магомедова А.Д.¹, Козловская Г.В.¹,
Козловский Ю.Е.¹, Хомяков Ю.Н.²

1- Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ
морфологии человека» Москва, Россия

2 – ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора, Москва

Введение. Термин «микробная транслокация» введен Р.Бергом в 1985 году, и понимается как прохождение жизнеспособных бактерий и их токсинов из кишечника через слизистую оболочку в лимфатические узлы, кровотока, печень, селезенку, и другие органы макроорганизма-«хозяина». Транслокация бактерий в здоровом организме осуществляется постоянно и поддерживается на некотором, оптимальном для каждой индивидуальной системы «хозяин-микробиом» уровне [4]. Механизм транслокации направлен на поддержание стабильного и успешного функционирования иммунной и эндокринной систем. Гомеостаз эпителия толстой кишки требует постоянного поддержания баланса между реактивностью и толерантностью к просветной микрофлоре. Регулирующую роль плотности бактериальных популяций микроорганизмов на поверхности слизистой оболочки кишечника играют антибактериальные пептиды и нейтрофилы «хозяина». При патологических состояниях (стрессе, травмах, ожогах, различных шоках, кишечной непроходимости) происходит резкое повышение проницаемости кишечного барьера, усиление процессов транслокации, что приводит к нарушению контроля со стороны иммунной системы, и, как следствие, к увеличению бактериальной нагрузки на органы-мишени.

Цель исследования: оценить увеличение бактериальной нагрузки на органы в разные сроки при моделировании экспериментального колита,

вызванного употреблением декстрансульфата натрия (ДСН) у мышей линии C57Bl/6

Ключевые слова: бактериальная транслокация, гипертранслокация, ДСН-колит, воспаление, мыши

Материалы и методы: в эксперименте были использованы половозрелые мыши самцы линии C57Bl/6 массой тела 18-20 г, питомник «Столбовая» (20 животных). Выведение животных из эксперимента проводили в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных" (Приложение к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г.) и Правилами лабораторной практики в РФ, утвержденными Приказом МЗ РФ N267 от 19.06.2003. Животные были поделены на 2 группы, все животные получали стандартный полнорационный гранулированный корм ПК 121-10 (ГОСТ-Р 50258-92). Контрольная группа употребляла обычную питьевую воду в течение всего срока эксперимента. Моделирование язвенного колита проводили по I. Okayasu (1990) [2]: в опытной группе мыши потребляли вместо питьевой воды 2% водный раствор ДСН (Sigma, MW 40 000 Da).

Животных обеих групп выводили из эксперимента через 2, 4, 12 и 24 часа после начала употребления ДСН. Для микробиологического исследования брали кусочки печени, легких, селезенки и мезентеральный узел. Для гистологического исследования брали образцы печени, дистального отдела толстой кишки, легкого, тимуса и селезенки.

Результаты и обсуждение. По данным гистологического исследования в толстой кишке мышей контрольной группы не было выявлено никаких признаков патологии, структура эпителиальной выстилки была непрерывна на протяжении всей слизистой оболочки, крипты глубокие с узкими просветами. В собственной пластинке слизистой оболочки встречалось незначительное количество гистиоцитов и лимфоцитов. Мышечная пластинка и подслизистая основа также были без признаков патологии. У мышей опытной группы в собственной пластинке слизистой оболочки и подслизистой основе была незначительная воспалительная инфильтрация, преимущественно из нейтрофилов, и с примесью лимфоцитов с небольшим отеком подслизистого слоя. Отмечались также гипертрофия бокаловидных клеток.

По данным микробиологического исследования при развитии экспериментального колита у мышей в первые 2-4 часа происходило нарушение эпителиального барьера с гипертранслокацией бактерий из просвета толстой кишки в собственную пластинку, в ответ на которую развивается нейтрофильная реакция. Повышение бактериальной нагрузки в мезентеральном лимфатическом узле отмечалось через 24 часа после начала употребления ДСН. Статистически значимого повышения бактериальной нагрузки на печень и селезенку в исследуемые сроки не происходило. По данным следующей серии экспериментов, бактериальная нагрузка в органах у мышей статистически значимо повышалась после того, как при употреблении более высокой концентрации ДСН (5%) в модели развивались клинические признаки язвенного колита [5].

Таким образом, можно предположить, что на начальном этапе при употреблении мышами 2% раствора декстрансульфата натрия на слизистую оболочку толстой кишки происходило компенсированное повышение транслокации, вызывающее ответную воспалительную реакцию организма, призванную предотвратить перемещение микроорганизмов из типичного для них локуса обитания (толстая кишка) в другие компартменты организма. Более интенсивное (концентрация ДСН 5%) и/или продолжительное повреждающее действие может приводить к усилению процессов воспаления, выраженному нарушению барьерной функции кишечного эпителия, повышению бактериальной нагрузки на органы и развитию внекишечных осложнений язвенного колита.

Процесс неконтролируемого проникновения в кровеносное русло и атипичные локусы повышенного количества микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности может быть назван «гипертранслокацией» или «патологической транслокацией» в отличие от нормально протекающего процесса транспорта бактерий из толстой кишки в экстраинтестинальные участки организма. Гипертранслокация может протекать на фоне нормобиома и при участии патологически измененного микробиома.

Усиление процесса транслокации отмечается при качественных и количественных сдвигах в структуре микробиома кишки под действием антибиотиков, химиопрепаратов, лучевой терапии. Это явление известно под названием «дисбиоз» и оно должно изучаться в контексте пускового звена гипертранслокации и последующих патологических процессов в печени, легких, суставах и других органах [3].

К гипертранслокации, на наш взгляд, следует также относить синдром избыточного роста бактерий в тонкой кишке, развивающийся при употреблении антацидных препаратов. Результатом этого процесса становится инфицирование желчного пузыря и поджелудочной железы, при этом в качестве инфекционного агента могут выступать представители нормофлоры толстой кишки.

Таким образом, при рассмотрении этиологии и патогенеза значительной части заболеваний у человека следует учитывать нарушения баланса «хозяин - микробиом» и разрабатывать подходы к коррекции дисбаланса медикаментозными и немедикаментозными способами.

Список литературы

1. Berg, R. D. Bacterial translocation from the intestine //Jikken Dobutsu. Experimental animals. 1985.-34:1.-1-16.
2. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice//Gastroenterology.-1990.-98(3).-694-702
3. Козловский Ю.Е., Козловская Г.В. Петрова В.А. Пустовалов С.А. Магомедова А.Д., Чертович Н.Ф. Хомякова Т.И. Полевская О.С. Серебряков С.Н.
4. Дисбактериозы желудочно-кишечного тракта и пути их коррекции// Кролиководство и звероводство.-2013.-№ 4.-24-28. Никитенко, Н. И.

Роль транслокации бактерий в патогенезе хирургической инфекции / Н. И. Никитенко, В.В. Захаров, А.В. Бородин // Хирургия.-2001.-2.-63–66.

5. Хомякова Т. И. Золотова Н. А. Цыганова С. О. Макарова О. В. Диатроптов М. Е. Пономаренко Е. В. Хомяков Ю. Н. Терапевтические подходы к коррекции морфологических и иммунологических сдвигов при язвенном колите (экспериментальное исследование) // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.- 2015- вып.117.- № 5.-118

МЕДИЦИНСКАЯ ПИЯВКА *HIRUDO MEDICINALIS* КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГИПЕРТРАНСЛОКАЦИИ БАКТЕРИЙ-СИМБИОНТОВ *AEROMONAS SPP*

Хомякова Т.И.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ морфологии человека» Москва, Россия

Введение. Простой моделью для исследования транслокации может стать медицинская пиявка *Hirudo medicinalis*, симбионты которой, - *Aeromonas spp.*- обеспечивают как переваривание пищи, так и продукцию ферментов слюны. При нарушении содержания пиявок происходит избыточный рост бактерий, аэромонадное инфицирование кутикулы с разрушением слизистого слоя и образованием перетяжек, взбуханием кутикулы и изъязвлением, что приводит к гибели животных. Цель исследования: изучить возможность использования пиявки *Hirudo medicinalis* в качестве модели развития гипертранслокации при нарушении баланса в симбиотической системе «хозяин-микробиом».

Ключевые слова: бактериальная транслокация, гипертранслокация, воспаление, медицинская пиявка, *Aeromonas spp.*

Материалы: пиявки медицинские *Hirudo medicinalis*, (ЗАО «Международный центр медицинской пиявки», п. Удельная, МО). Метод исследования: микробиологические посеы воды, в которой содержались пиявки, посеы печаткой различных участков кутикулы, присосок, содержимого кишечника и поперечных срезов пиявки на разном уровне на агар Лурия Бертани и селективную среду для аэромонад *A. hydrophila* (Hi-Media Laboratories, Индия) до единичных колоний, идентификация выделенных бактерий по ферментативной активности, окрашивание гистологических срезов по Романовскому – Гимзе. Нарушение баланса в симбиотической системе вызывали содержанием опытной группы (5 пиявок) на свету в течение 5 дней. Контрольная группа (5 пиявок) находились при комнатной температуре в затененном месте с ежедневной сменой воды и промыванием пиявок, как это указано в рекомендациях производителя. Регистрация внешних признаков состояния пиявок – перетяжки, вялость, взбухания на кутикуле. Фиксация путем погружения в 10% формалин с последующей гистологической обработкой. Результаты: из всей образцов воды, в которой содержались пиявки

как опытной, так и контрольной групп, были выделены мономорфные грамотрицательные палочковидные бактерии, вытеснившие другие аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, способные расти на агаре Лурия-Бертани, до уровня менее 1000. Количество таких бактерий в воде опытной группы превышало 10^{10} КОЕ /мл, в воде контрольной группы составляло 10^5 КОЕ /мл.

Все выделенные бактерии росли на селективной питательной среде и были идентифицированы по культуральным свойствам как представители семейства *Aeromonas* spp. У пиявок, содержащихся в соответствии с требованиями производителя в течение периода наблюдения поведенческая активность и внешний вид не имели особенностей. В отпечатках с брюшной и спинной поверхности кутикулы и задней присоски, а также при посеве содержимого эндодермального отдела кишечника был активный рост аэромонад. В отпечатках с передней присоски рост бактерий был незначительным, из содержимого глотки бактерии не выделялись. При окрашивании по Романовскому – Гимзе на продольных и поперечных срезах пиявки были выявлены бактерии в составе биопленки, покрывающей поверхность кутикулы и в эндодермальном отделе («карманах» кишечника), причем в последних они образовывали шарообразные колонии. В опытной группе у пиявок были перетяжки и взбухания. Животные были малоподвижны, не реагировали на внешние стимулы. При посеве количество бактерий в содержимом эндодермального отдела кишечника статистически значимо не отличалось от контроля, бактерии выделялись из всех исследуемых участков, в том числе из глоточного отдела с передней присоски.

Вывод: При нарушении содержания пиявок неконтролируемое размножение бактерий-симбионтов, выделяемых из анального отверстия червей и распространение бактерий – симбионтов за пределы кишечника. При развитии гипертранслокации происходит распространение бактерий в участки, которые должны быть свободными от бактериальной нагрузки, что приводит к инфицированию и гибели животного. Медицинская пиявка может служить простой и дешевой моделью для изучения механизмов транслокации микроорганизмов из пищеварительной системы в другие компартменты организма хозяина.

GAMMA-IRRADIATED BIFIDOBACTERIA ESTABLISH A PROTECTIVE EFFECT ON MICE TO EXPERIMENTAL RADIATION EXPOSURE

Sychev K.V.¹, Nizamov R.N.²

¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia

²Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Tatarstan, Russia

Abstract. The purpose of this work is to assess the radioprotective effect exerted by the irradiated form of *Bifidobacterium bifidum* probiotic on experimentally irradiated mice. As a result of the research, we were able to determine experimentally the optimal dose of gamma rays (12–14 Gy) that ensures a switching of the metabolism of probiotic microorganisms towards the synthesis of both interferon (a mediator of immunopoiesis) and superoxide dismutase (an antiradical enzyme). The mice were exposed to 8.0g doses of (¹³⁷Cs) gamma radiation at an exposure dose rate of $3,13 \times 10^{-5}$ cl/kg·s. Twenty four hours after the exposure, the animals were administered subcutaneously a single 0.2 ml dose 1×10^8 CFU (¹³⁷Cs) of either native bifidobacterin or the radiation-modified form of this probiotic. The radioprotective effect was evaluated according to various parameters, such as the change in hematological parameters, the quantitative composition of the gut microbiome, and the ability of the drug to induce the release intercellular interaction mediators (interferons). A single subcutaneous injection of 1×10^8 CFU of either native bifidobacterin or its irradiated form, administered in the composition of the growth medium 24 hours after the irradiation, protects 60 to 80% of lethally irradiated white mice. The radioprotective effect of the biopreparation is associated with a milder form of acute radiation syndrome, makes pancytopenia less severe (1.13–1.21 times against 2.7–4.9 times in the irradiated control group), and reduces the number of opportunistic enterobacteria (2.2 lg against 4.9 lg in the irradiated animals) in the intestine.

ОБЛУЧЕННАЯ КУЛЬТУРА BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM ФОРМИРУЕТ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛУЧЕВОЙ БОЛЕЗНИ

Сычев К.В.¹, Низамов Р.Н.²

¹ – ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Россия

² – ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань, Россия

Для профилактики и лечения различных заболеваний, сопровождающихся формированием дисбактериоза, широко применяются препараты, содержащие микроорганизмы нормальной микрофлоры кишечника. Целью настоящей работы было исследование радиозащитной активности

радиомодифицированного варианта пробиотика на основе *Bifidobacterium bifidum* на организм экспериментально облученных мышей.

Объектом исследования явился радиомодифицированный вариант пробиотика «Бифидумбактерин», содержащий 5×10^8 КОЕ/мл живых бифидобактерий (*Bifidobacterium bifidum* штамм 1). Для определения оптимальной дозы облучения взвесь бифидобактерий подвергали облучению гамма-лучами ^{60}Co на установке «Исследователь ИН-1» в дозе от 1 до 20 Гр. Для оценки влияния облучения на бифидобактерии определяли интенсивность синтеза фермента супероксиддисмутазы (СОД). Изучение радиозащитной активности нативного и радиомодифицированного варианта пробиотика проводили на белых мышах. Испытуемый препарат вводили подкожно по 0,2 мл из расчета 1×10^8 КОЕ/масса тела. Облучение экспериментальных животных проводили на гамма-установке (^{137}Cs) в дозе 8,0 Гр при мощности экспозиционной дозы $3,13 \cdot 10^{-5}$ Кл/кг·с. Радиозащитный эффект оценивали по изменению гематологических показателей, по количественному составу аутофлоры кишечника, по способности препарата индуцировать медиаторы межклеточного взаимодействия (интерфероны). Критерием эффективности препарата служил процент выживших животных в течение 30 сут после облучения.

В результате проведенных исследований экспериментально подобрана оптимальная доза гамма-лучей (12-14 Гр), обеспечивающая переключение метаболизма пробиотических микроорганизмов на синтез медиатора иммунопоэза – интерферона и антирадикального фермента – супероксиддисмутазы.

Через 24 ч после экспериментального облучения мышам вводили однократно подкожно бифидумбактерин в дозе 0,2 мл (1×10^8 CFU) и его радиомодифицированный вариант. Результаты гематологических исследований показали, что характерным нарушением системы крови у облученных животных была панцитопения, выражавшаяся в снижении уровня циркулирующих лейкоцитов (в 5,3 раза), лимфоцитов (в 4,4 раза), нейтрофилов (в 5,6 раза), тромбоцитов (в 3,2 раза) и эритроцитов (в 1,16 раза). У животных, получавших пробиотики (нативный и облученный бифидумбактерин), эти показатели по всем срокам изменялись менее интенсивно (в 2,1 и 1,6 раза по лейкоцитам, в 1,8 и 1,1 по эритроцитам, в 2,7 и 1,9 по нейтрофилам, в 1,2 и 0,8 по тромбоцитам и в 0,76 и 0,45 по эритроцитам, соответственно), чем у незащищенных. При этом отмечено, что предупреждение радиоиндуцированной панцитопении у облученных и леченных радиобифидумбактерином животных было более выраженным, чем у животных, получавших нативный бифидумбактерин. Также наблюдалась положительная динамика синтеза интерферона в облученных и леченых группах. Результаты изучения микробной обсемененности кишечника показали, что на 5 сут после облучения отмечалось резкое увеличение количества колиформных единиц в фекалиях облученных нелеченных белых мышей (контрольная группа). Так, если в период разгара острой лучевой болезни у мышей наблюдалось увеличение микробов в испражнениях на 4,9 lg, то у

облученных и леченных пробиотиками (бифидумбактерин и радиобифидумбактерин) количество условно-патогенной микрофлоры было в 2 раза меньше, чем в предыдущей группе (2,2 lg).

Было установлено, что однократное, подкожное введение нативного или радиомодифицированного вариантов бифидобактерина в составе среды выращивания в дозе $1,43 \times 10^6$ м.к./кг через 24 часа после облучения, предохраняет 60-80% летально облученных белых мышей. Радиозащитный эффект биопрепарата проявляется в более легком течении острой лучевой болезни, меньшей выраженности панцитопении, снижении количества условно-патогенных энтеробактерий в кишечнике.

SPECTRUM AND ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES IN FECES OF PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

Zinkevich O.D.¹, Mukhametova D.D.²,
Saphina N.A.^{1,2}, Koporulina M.O.¹

¹ –Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

² - Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Proteolytic enzymes - one of the main links in the pathogenesis of nonspecific intestinal diseases (IBD), such as ulcerative colitis, Crohn's disease and irritable bowel syndrome. Involvement of enzymes in pathogenesis is associated with the destruction of mucin, intercellular matrix proteins and the activation of protease-activated receptors, which leads to a disruption of the integrity of the intestinal barrier.

The aim of the research: to study the activity, molecular profile and specificity of proteolytic enzymes in the feces of patients with IBD.

Methods: radial diffusion in agarose gel containing gelatin and protease inhibitors; Zymography (native electrophoresis in PAGE with SDS and protein substrate). The activity of the enzymes was expressed in PU / g of feces / 1 hour.

Results. Total proteolytic activity of feces – in control group 51.7 [39.8; 297] (N = 20), in group with IBD 412.6 [89.2; 1192.7] (N = 133), $p = 0.000394$. An exacerbation stage of IBD 826.5 [118.7; 1194] N = 31, in remission 68 [40; 580.2], $p = 0.000002$. The activity of serine proteases was $53 \pm 14.21\%$ of the total activity in the control. The part of metalloenzymes is $36 \pm 18.45\%$, part of thiol proteinases - $11 \pm 4.82\%$. An exacerbation stage of IBD: the level of serine proteinases ranged from 64 to 91% ($82.43 \pm 13.44\%$), $p < 0.01$ with respect to the control group; part of metalloenzymes from 15 to 31% ($26.42 \pm 14.08\%$), $p > 0.5$; thiol enzymes - from 3 to 11% ($4.82 \pm 5.06\%$), $p > 0.5$. Zymographic analysis showed the presence of active fractions with a molecular weight distribution from 20-24 kD to 140-180 kD. Serine proteinases were located between 20 and 60 kD, metalloenzymes generally had molecular weights from 80 to 180 kD. The main part of serine proteinases corresponded to the molecular mass of trypsin - 20-24 kD.

Conclusions. Patients with IBD characterized by high proteolytic activity of feces in comparison with the control group. During the remission, activity don't differ from control. An exacerbation stage, the high activity of proteases is due, mainly, to serine (trypsin-like) enzymes. To monitor the course of IBD treatment, we recommend measuring the total proteolytic activity of feces by radial diffusion using gelatin as a protein substrate.

СПЕКТР И АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ФЕКАЛИЯХ ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Зинкевич О.Д.¹, Мухаметова Д.Д.²,
Сафина Н.А.^{1,2}, Копорулина М.О.¹

¹ – КГМА - филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань, Россия
² - ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Россия

Протеолитические ферменты являются одним из основных звеньев в патогенезе неспецифических заболеваний кишечника (ВЗК), к которым относятся язвенный колит, болезнь Крона и синдром раздраженного кишечника. Их участие в патогенезе связывают с разрушением муцина, белков межклеточного матрикса и активацией протеазо-активируемых рецепторов, что в свою очередь приводит к нарушению целостности кишечного барьера.

Цель исследования – изучить активность, молекулярный профиль и специфичность протеолитических ферментов в фекалиях пациентов с ВЗК.

Методы исследования: радиальная диффузия в геле агарозы с содержанием желатина и ингибиторов протеаз; зимография (нативный электрофорез в ПААГ с ДДС Na и белковым субстратом). Активность ферментов выражали в PU/г кала/1 час.

Результаты. Тотальная протеолитическая активность фекалий – контроль 51,7[39,8; 297] (N = 20), ВЗК 412,6 [89,2; 1192,7] (N = 133), p = 0,000394. При обострении ВЗК 826,5 [118,7; 1194] N = 31, в ремиссии 68 [40; 580,2], p = 0,000002. Активность сериновых протеиназ составила в контроле 53±14,21% от тотальной активности. Доля металл-зависимых ферментов - 36±18,45%. Тиоловые протеиназы - 11±4,82%. При обострении ВЗК: доля сериновых протеиназ колебалась от 64 до 91% (82,43±13,44%), p < 0,01 по отношению к контрольной группе; металл-зависимые от 15 до 31 % (26,42±14,08%), p > 0,5; тиоловые ферменты – от 3 до 11% (4,82±5,06%), p > 0,5. Зимографический анализ показал наличие активных фракций с распределением по молекулярным массам от 20-24 kD до 140-180 kD. Сериновые протеиназы располагались между 20 и 60 kD, металлзависимые в основном имели молекулярные массы от 80 до 180 kD. Основная доля сериновых протеиназ соответствовала молекулярной массе трипсина – 20-24 kD.

Выводы. Для ВЗК характерна высокая протеолитическая активность фекалий по сравнению с контрольной группой. Во время ремиссии активность не отличалась от контроля. При обострении высокая активность протеаз обусловлена, в основном, сериновыми (трипсино-подобными) ферментами. Для мониторинга хода лечения ВЗК мы рекомендуем измерять тотальную протеолитическую активность фекалий методом радиальной диффузии с использованием в качестве белкового субстрата желатин.

SPECTRUM OF PROTEOLYTIC ENZYMES IN BLOOD SERUM AND COPROFILTRATES IN PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS

Zinkevich O.D.¹, Saphina N.A.^{1,2}, Chikaev V.F.², Malkov I.S.¹, Koporulina M.O.¹,
Aidarov A.R.²

¹ –Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

² - Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Currently, the hypothesis of the central role of the intestine in the development of SIRS and multiple organ failure is increasingly confirmed in experimental and clinical studies. The main "culprit" of this, according to Hugli T.E, Schmid-Schonbein G.W, luminal pancreatic enzymes. Normally, the intestine is protected from self-digestion by a layer of mucin, so the passage of enzymes through this barrier is minimal. However, if the barrier is broken in the presence of digestive enzymes, they generate cytotoxic mediators which transported through the portal venous system and the lymphatic system of the intestine into the systemic circulation, resulting in SIRS and multiple organ failure.

Compared with other organs and tissues, the intestine contains a large number of endogenous and exogenous proteases. The sources of these enzymes are pancreas, resident intestinal cells and microbiota, and, in our opinion, all enzymes can participate in the development of SIRS.

The origin of the intestinal enzymes and their contribution to the pathological process has not been studied sufficiently. Decoding of the individual profile of microbial, resident intestinal cells, inflammatory cells and digestive enzymes of the pancreas in feces and blood will allow to establish their contribution to the development of the pathological process and to create in the future approaches to the prevention and treatment of this group of diseases.

The aim of the research: to study the profile of proteolytic enzymes in serum and feces in patients with acute pancreatitis.

Materials and methods: Serums and feces in patients with acute pancreatitis and in healthy individuals were studied for the presence of proteolytic enzymes and their profile for molecular masses and types of active sites. The enzymes were determined by the zymographic method, using gelatin as the substrate.

Results: In the serum of patients with acute pancreatitis were detected 3 to 7 protein fractions with a molecular weight of 23kD to 220kD with proteolytic activity. The use of inhibitors has shown that they belong to metalloenzymes and serine proteases. Feces also exhibited high proteolytic activity with a predominance of serine proteases. In feces was registered a high, in comparison with healthy, activity of enzymes, with molecular mass of the corresponding trypsin.

Conclusion: The appearance of proteolytic enzymes in the serum of patients with acute pancreatitis can talk about their participation in the pathological process. Their identification will reveal the source of their origin, however, further research is needed.

СПЕКТР ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ И ФЕКАЛИЯХ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ

Зинкевич О.Д.¹, Сафина Н.А.^{1,2}, Чекаев В.Ф.²,
Копорулина М.О.¹, Айдаров А.Р.²

¹ – КГМА - филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань, Россия
² - ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Россия

В настоящее время гипотеза о центральной роль кишечника в развитии синдрома системной воспалительной реакции (ССВР) и полиорганной недостаточности (ПОН) находит все большее подтверждение в экспериментальных и клинических исследованиях. Основным «виновником» этого, по мнению Hugli T.E, Schmid-Schonbein G.W, являются люминальные панкреатические ферменты. В норме кишечник защищен от аутопереваривания слоем муцина, поэтому пассаж ферментов через этот барьер минимален. Однако, если барьер нарушен в присутствии пищеварительных ферментов, то они генерируют цитотоксические медиаторы, которые транспортируются через портальную венозную систему и лимфатическую систему кишечника в системную циркуляцию, приводя к ССВР и полиорганной недостаточности.

По сравнению с другими органами и тканями, кишечник содержит большое количество как эндогенных, так и экзогенных протеаз. Источниками этих ферментов являются поджелудочная железа, резидентные клетки кишечника, а также микробиота, поэтому все ферменты, по нашему мнению, могут принимать участие в развитии ССВР.

Происхождение ферментов кишечника и их вклад в патологический процесс изучено не достаточно. Расшифровка индивидуального профиля микробных, резидентных клеток кишечника, воспалительных клеток и пищеварительных ферментов поджелудочной железы в фекалиях и кровотоке, позволит установить их вклад в развитие патологического процесса и разработать в будущем подходы к профилактике и лечению данной группы заболеваний.

Цель работы - изучить профиль протеолитических ферментов в сыворотках и фекалиях у больных с острым панкреатитом.

Материалы и методы: были исследованы сыворотки, фекалии у больных острым панкреатитом, а также у здоровых лиц на наличие в них протеолитических ферментов, а также их профиль по молекулярным массам и типам активных центров. Ферменты определяли зимографическим методом с применением в качестве субстрата желатина.

Результаты: в сыворотках больных острым панкреатитом обнаружено от 3 до 7 белковых фракций с молекулярной массой от 23кД до 220кД, обладающих протеолитической активностью. Применение ингибиторов показало их принадлежность к металл- и серинзависимым протеазам. Фекалии также проявляли высокую протеолитическую активность с преобладанием сериновых протеиназ. В фекалиях регистрировалась высокая, по сравнению со здоровыми, активность ферментов, по молекулярной массе соответствующих трипсину.

Заключение: появление протеолитических ферментов в сыворотке больных острым панкреатитом свидетельствует об их участии в патологическом процессе. Их идентификация позволит выявить источник их происхождения, однако, необходимы дальнейшие исследования.

ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF THE ERADICATING HELICOBACTER PYLORI (MAASTRICHT V - 2016)

Kugler T.E.

M. Gorky Donetsk National Medical University, Donetsk

Helicobacter Pylori is a human pathogen, that occurs in ~ 50% of the world`s population [1]. Prevalence in some regions is higher still, for example 80% or more in China, and some Eastern European and South American countries [2]. The infection rate reaches 64-90% in Russia [3]. As known *H.Pylori* can manifest in a very wide range - from asymptomatic carriage to malignant diseases. Gastric cancer, despite declining in incidence in Western countries, remains the fifth most common cancer in terms of incidence, and is the third most common cause of cancer death worldwide, responsible for nearly three-quarters of a million deaths per year in appliance with GLOBOCAN for 2012 [1]. According to the recommendations of Maastricht V (2016), the screening and treatment of *H.Pylori* remains the leading strategy for the prevention of gastric cancer and it also has the additional benefits of reducing the incidence of peptic ulcer disease and the economic burden of dyspepsia. However, we have to know about negative consequences of the widespread elimination of *H.Pylori*.

At first, increasing antibiotic resistance rates is a multidisciplinary problem, as *H.Pylori* eradication treatment contains broad-spectrum antibiotics. There may be

problems with treatment of serious and life-threatening infections in the future. All components of triple eradication therapy (PPI, clarithromycin, amoxicillin) can be risk factors for the development of *Clostridium difficile* infection [4]. Pseudomembranous colitis should be suspected in any patient with watery diarrhea during or after *H.Pylori* eradicating.

Unfortunately, most meta-analyzes, including the Cochrane Review 2013, do not report dangerous side effects of eradication [1]. So, we conducted own research using Pubmed data. First of all, cardio- and nephrotoxic effects of antibacterial drugs and acid-suppressive therapy were studied. The acute renal failure was detected among 18% patients conducted amoxicillin. Triple therapy with metronidazole and clarithromycin, but not amoxicillin, can be used for *H.Pylori* eradication in patients with chronic renal insufficiency, because it is more effective, well tolerated and less likely to cause deterioration of renal function [5]. The using of clarithromycin in eradication was associated with an increased risk of myocardial infarction and arrhythmia, as well as the development of neuropsychiatric disorders [6,7].

An increase in the prevalence of negative disease associations of *H.Pylori* is another problem of the population screening and treatment of the infection. While an association has been suggested between declining rates *H.Pylori* infection and gastric cancer, the increase in prevalence of gastroesophageal reflux disease (GERD), Barrett's esophagus and adenocarcinoma of the esophagus occurs more often [8]. Maastricht V also provides clear evidence for the reverse association of *H.Pylori* and both atopic diseases and obesity [9].

Finally, the eradication of *H.Pylori* should not be applied to all infected patients because of serious adverse events and high antibiotic resistance rates. An individual approach is necessary for using due to potential benefits and harms of the eradicating. Doctors should provide baseline examinations (blood and urine tests, glomerular filtration rate, ECG or Holter monitor) and carefully collect a medical history including the fact of taking antibiotics throughout 3-6 months prior to eradicating; allergy and concomitant diseases, such as chronic renal failure; presence of diseases that are negatively associated with *H.Pylori*; high cardiovascular risk. Public health should consider the eradication of *H.Pylori* in such paradigm in our point of view.

References:

1. O'Connor A. O'Morain C. Ford A. Population screening and treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Nature reviews. Gastroenterology and Hepatology* 2017;14: 230-240. DOI:10.1038/nrgastro.2016.195
2. Eusebi L. et al. *Epidemiology of Helicobacter pylori Infection*. John Wiley & Sons Ltd. *Helicobacter*. 2014; 19 (1): 1–5.
3. Lazebnik L.B, Vasiliev Yu.V. Shcherbakov P.L. et al. *Helicobacter pylori: prevalence, diagnosis, treatment*. *Experimental and clinical gastroenterology*. 2010; 2: 3-7.
4. Adamsson I. Edlund C. Nord C.E. Impact of treatment of *Helicobacter pylori* on the normal gastrointestinal microflora. *Clin Microbiol Infect*. 2000; 6(4):175–7.

5. Sheu B.S, Huang J.J, Yang H.B, Huang A.H, Wu J.J. The selection of triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in chronic renal insufficiency. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17:1283-90.
6. Wong A. et al. Cardiovascular outcomes associated with use of clarithromycin: population based study. *BMJ* 2016; 352:1-11. DOI: 10.1136/bmj.h6926.
7. Wong A. et al. Association Between Acute Neuropsychiatric Events and *Helicobacter pylori* Therapy Containing Clarithromycin. *JAMA Intern Med.* 2016; 176(6):828-834. DOI:10.1001/jamainternmed.2016.1586.
8. Blaser M.J. Chen Y. Reibman J. Does *Helicobacter pylori* protect against asthma and allergy? *Gut.* 2008; 57(5): 561–567.
9. Engler D.B. Reuter S. Wijck Y. Et al. Effective treatment of allergic airway inflammation with *Helicobacter pylori* immunomodulators requires BATF3-dependent dendritic cells and IL-10. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:11810-15.

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ЭРАДИКАЦИИ HELICOBACTER PYLORI (МААСТРИХТ V - 2016)

Куглер Т.Е.

Донецкий Национальный медицинский университет им. Максима Горького,
Донецк

По данным 2017 года *H.Pylori* встречается у ~50% населения [1]. Распространенность в некоторых регионах еще выше, например, 80 % и более в Китае, а также в некоторых восточноевропейских и южноамериканских странах [2], в России инфицированность достигает 64-90 % [3]. Известно, что данная инфекция может проявляться в очень широком диапазоне — от бессимптомного носительства до рака желудка. Рак желудка, несмотря на снижение заболеваемости в западных странах, по данным GLOBOCAN 2012 года остается пятым по распространенности и третьим по частоте среди причин смертности от рака во всем мире, ответственным за почти три четверти миллиона смертей в год [1]. Согласно рекомендациям Маастрихт V (2016) стратегия «screen and treat» остается ведущей в целях профилактики рака желудка, при этом имеет дополнительные выгоды - уменьшение заболеваемости язвенной болезнью, снижение распространенности и стоимости лечения диспепсии. Однако следует учитывать и негативные последствия повсеместной элиминации *H.Pylori*.

В первую очередь, растущая антибиотикорезистентность является мультидисциплинарной проблемой, поскольку схемы эрадикации *H.Pylori* содержат антибиотики широкого спектра действия и в будущем это может иметь последствия при лечении серьезных и угрожающих жизни инфекций. Все компоненты тройной эрадикационной терапии (ИПП, кларитромицин, амоксициллин) являются потенциальными факторами риска развития инфекции

Clostridium difficile [4], поэтому псевдомембранозный колит следует подозревать у любого пациента с водянистой диареей во время или после эрадикации *H. Pylori*. К сожалению, в большинстве мета-анализах, а том числе Кокрановском обзоре 2013 года не сообщается о серьезных или опасных для жизни побочных эффектах эрадикации [1]. В связи с этим, был проведен собственный поисковый анализ данных базы «Pubmed». В первую очередь изучались кардио- и нефротоксичные эффекты антибактериальных препаратов и кислотосупрессивной терапии. Так, частота острого повреждения почек составила 18% при применении амоксициллина по данным исследования В.С. Sheu и соавт. [5], посвященному выбору схемы эрадикационной терапии у пациентов с хронической почечной недостаточностью (ХПН). Было выявлено, что применение кларитромицина в схемах эрадикации ассоциируется с повышенном риском инфаркта миокарда и аритмией, а также развитием нейропсихического расстройства по данным Wong А. и соавт. 2016 года [6,7].

Еще одной проблемой стратегии «screen and treat» является рост числа заболеваний, негативно ассоциированных с *H. Pylori*. В то время как распространенность язвенной болезни и аденокарциномы желудка уменьшается по мере снижения распространенности *H. Pylori*, растет заболеваемость гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и ее последствий - пищевода Барретта и аденокарциномы пищевода [8]. В Маастрихт V приводятся также четкие доказательства обратной ассоциации частоты инфицирования *H. Pylori* и распространенности ожирения и бронхиальной астмы [9].

Таким образом, стратегия «screen and treat» не должна применяться ко всем без исключения пациентам, учитывая серьезность побочных эффектов эрадикации и рост антибиотикорезистентности. Необходим индивидуальный подход перед проведением антихеликобактерной терапии: тщательный сбор анамнеза с учетом предшествующего приема антибиотиков в течение предыдущих 3-6 месяцев, наличия сопутствующих заболеваний, в частности ХПН, оценка кардиоваскулярного риска, проведение стандартных обследований. Врач должен знать, что колонизация *H. Pylori* снижает риск заболеваний пищевода (в том числе злокачественных), бронхиальной астмы и атопии, а также, возможно, ожирения и сахарного диабета, и учитывать это при назначении лечения. В рамках такой парадигмы, общественное здравоохранение должно рассматривать проблему инфицированности и эрадикации *H. Pylori*.

EFFECTS OF RADIOTHERAPY ON LACTOBACILLI OF HUMAN NORMAL GUT MICROBIOTA

Do T.D., Rychakova Zh., Ismagilova R.K., Goenko I.A.,
Bukhmin V.S., Yarullina D.R.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Currently, radiotherapy utilizing gamma rays, and charged particle beams, is permanently present in oncology as a treatment method for certain types of cancer located in the pelvis and abdomen. Ionizing radiation (IR), apart from the desired effect, that is damaging or destruction of cancer cells, also affects the surrounding normal tissues which is associated with certain symptoms in patients, among which are local intestinal inflammation, infections in the female genital tract, and most frequently chronic diarrhea, which is observed in as many as 80% of patients. In order to minimize the negative side effects of radiation therapy and improve the quality of life for patients we studied IR resistance of 12 *Lactobacillus* isolates.

The *Lactobacillus* strains, isolated from gastrointestinal tract of healthy people, and reference strains, obtained from commercial probiotics, were tested for resistance to the dose of 50 Gy, corresponding to the total dose of the complete cycle of radiotherapy used in external beam radiotherapy for cancer. To irradiate the samples, a Rokus-M unit was used containing radioactive ^{60}Co source, provided by the Center of Nuclear Medicine (Kazan, Russia). Each *Lactobacillus* isolate has been identified to species level by mass-spectrometry with MALDI Biotyper (Bruker, Germany): *L. acidophilus* ($n=1$); *L. fermentum* ($n=2$); *L. plantarum* ($n = 5$); *L. rhamnosus* ($n=3$); *L. helveticus* ($n=1$). Viability of irradiated bacteria was estimated using propidium iodide staining and BD FACS Canto II flow cytometer (USA), and proved by plating on MRS agar. The results obtained suggest that therapeutic doses of IR do not significantly affect the survival of bacteria of the genus *Lactobacillus* living in the gastrointestinal tract of patients undergoing radiation therapy. Therefore, the described disorders in the composition of the bacterial flora in irradiated patients leading to diarrhea and local inflammation in the gastrointestinal tract may be the result of IR induced damage of the intestinal epithelium and consequent disruption of the entire gut ecosystem.

To further investigate the mechanisms used by *Lactobacillus* cells to survive exposure to IR, we screened essential genes involved in IR resistance in genomes of lactobacilli. Using PCR-amplification and subsequent Sanger DNA sequencing we identified *recF*, *recG*, *recN*, *uvrA*, *uvrB* genes in genomes of all tested *Lactobacillus* strains. Finally, we examined the whole-cell protein profiles of *L. plantarum* 8PA3 and *L. rhamnosus* I2L cells irradiated at the dose of 50 Gy. In *L. plantarum* 8PA3, using SDS-PAGE and silver staining we identified several proteins which showed more significant changes after radiation exposure, while in *L. rhamnosus* I2L protein profile was not affected by IR. The results also indicate that cellular processes which contribute to IR resistance are different within *Lactobacillus* species, as protein profiles of two strains were largely different.

This work was supported by the Russian Government Program for competitive growth of Kazan Federal University and RFBR grant No 15-04-02583. The research was performed using the equipment of Interdisciplinary centre for shared use of Kazan Federal University.

ВЛИЯНИЕ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ НА ЛАКТОБАЦИЛЛЫ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

До Т.З., Рычакова Ж.С., Исмагилова Р.К., Гоенко И.А.,
Бухмин В.С., Яруллина Д.Р.

ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет,
Казань, Россия

Лучевая терапия - лечение ионизирующей радиацией и пучками элементарных частиц из медицинского ускорителя – широко применяется для терапии злокачественных опухолей. Она нацелена на уничтожение опухолевых клеток, однако затрагивает и другие части организма. Так, процедуры лучевой терапии опухолей органов брюшной полости и малого таза часто сопровождаются развитием у пациентов явлений воспаления кишечника (энтерита, энтеропатии, мукозита и пр.), дисбактериоза и диареи. В данной работе, выполненной с целью выяснить, что происходит с полезной кишечной микрофлорой при проведении лучевой диагностики, впервые исследовано влияние ионизирующего излучения в диапазоне доз, используемых в лучевой терапии опухолей, на 12 штаммов лактобацилл нормальной микрофлоры кишечника человека.

В качестве объекта исследования использованы 12 штаммов пяти видов лактобацилл (*L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*), выделенных нами из пробиотических препаратов и желудочно-кишечного тракта человека. Видовая идентификация бактерий выполнена методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. Суспензии клеток лактобацилл стационарной фазы роста были подвергнуты воздействию излучения, генерированного с помощью гамма-терапевтического аппарата Rokus-M с радиоактивным источником ^{60}Co (Центр ядерной медицины, Казань). Используемая нами доза 50 Гр соответствует дозе, полученной пациентом за один полный курс лучевой терапии. Жизнеспособность бактерий определяли с помощью окрашивания йодидом пропидия и последующего анализа на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II, а также методом высева на MRS агар. В данной работе впервые показано, что ионизирующее излучение, применяющееся в лучевой терапии опухолей брюшного отдела и органов малого таза, не снижает жизнеспособность кишечных лактобацилл. Следовательно, описанные патологические состояния, возникающие у пациентов, получающих лучевую терапию, по-видимому, не связаны с гибелью бактерий, а обусловлены изменениями в слизистой кишечника и иммунной

системе организма. В геномах исследуемых бактерий с помощью секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК впервые были экспериментально обнаружены гены радиорезистентности *recN*, *urvA*, *urvB*, *recF*, *recG*. Анализ белковых профилей лактобацилл позволил обнаружить у *L. plantarum* 8РА3 ряд белков, экспрессия которых повышается в ответ на ионизирующее излучение с дозой 50 Гр, тогда как у *L. rhamnosus* I2L ионизирующее излучение не оказывало влияние на белковый профиль. Полученные результаты указывают также на то, что молекулярный ответ лактобацилл на ионизирующее излучение видоспецифичен.

Полученные нами данные о радиорезистентности лактобацилл служат основой научно обоснованного использования штаммов лактобацилл в бактериальных препаратах, которые могут быть применены в медицине и пищевой промышленности для коррекции дисбактериоза, вызванного воздействием на организм ионизирующего облучения.

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета с использованием оборудования Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ и при финансовой поддержке гранта РФФИ 15-04-02583.

PYROSEQUENCING ANALYSIS OF ORAL MICROBIOTA FROM PATIENTS WITH PRIMARY SJÖGREN'S SYNDROME

Jehan Alam, Youngnim Choi

Departments of Oral Microbiology and Immunology, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, South Korea.

Sjögren's syndrome (SS) is an autoimmune disorder that primarily targets the salivary and lacrimal glands leading to the dryness in the mouth and eyes. Overexpression of transcript induced by interferon (IFN), known as interferon signature suggest the potential role of viral infection as a triggering agent in the pathophysiology of SS. Although, the role of oral microbiota in the etiopathogenesis of SS is not known, growing evidence suggests association between the dysbiosis and pathogenesis of several autoimmune diseases. The present study aim was to characterize the microbiota from the oral cavity of patients with primary SS in comparison with sicca and healthy control individuals. Bacterial communities from the oral cavity of healthy control (HC, n=15), patients with sicca symptoms (SC, n=10) and SS (n=25) were analyzed by pyrosequencing of the 16S rRNA genes. Although, pyrosequencing data revealed drastic changes in the bacterial communities associated with the dryness of mouth. There was no significant difference in the alpha diversity. The species richness estimated by Chao1 in HC (425.51 + 80.96) was not significantly different from SC (385.91 + 67.87) and SS (426.59 + 83.71). Interestingly, the diversities of microbiota determine by Shannon index was

significantly changed in SS (4.54 + 0.44) as compared to the diversity in HC (4.28 + 0.34) and SC (4.19 + 0.42). Although a total 20 different phyla were detected from the saliva samples, Firmicutes, Proteobacteria Actinobacteria, Bacteroidetes and Fusobacteria encompass the majority of the sequences. At the genus level, Streptococcus which constituted up to 38.96 % of the oral microbiota from the HC group was increased in both SC (68.56%) and SS groups (67.48%). Neisseria, Haemophilus, Veillonella and Fusobacterium decreased both in SC and SS groups while Prevotella selectively increased in SS. Although the bacterial communities of SC and SS were similar to each other, the relative abundance of species/phylogenotypes was different between SC and SS. The change in abundance of oral bacterial species and association with SS risk was determined by logistic regression analysis using a forward method, *Prevotella melaninogenica* was found associated with increased SS risk (OR 5.396 per 1% increase, CI 95% 1.793-16.238, $p=0.003$). In conclusion, dysbiosis of oral microbiota occurs in dry mouth condition, and *Prevotella melaninogenica* have been identified associated with SS risk, this knowledge may provide a new insight in the diagnostic or pathogenesis of SS.

Key words: Sjögren's Syndrome, Pyrosequencing, *Prevotella melaninogenica*, Dysbiosis

ZIKV INFECTION REGULATES INFLAMMASOMES PATHWAYS FOR REPLICATION IN MONOCYTES

Khaiboullina S.F.^{1,2}, Sarkar R.¹, Gorzalski A.³, Jeor St.^{1,3}, Verma S.C.¹

¹Department of Microbiology and Immunology, UNR, Reno NV

²Kazan Federal University, Kazan, Russia

³Genequest LLC, Reno NV

Zika virus (ZIKV) was recently linked to microcephaly in the newborns. It is believed that ZIKV can disseminate and cross the placenta to infect the fetus. However, the mechanism of transplacental dissemination of ZIKV remains unknown. Monocytes can cross tissue barriers, including the placenta and introduce pathogens to the sites normally protected from the infectious assault. Therefore, we sought to determine whether monocytes could disseminate ZIKV. To this end monocytes were infected with two strains of ZIKV: South American (PRVABC59) and Nigerian (IBH30656) isolates. We found that monocytes were susceptible to infection with both the strains and resulted in an altered expression of a large number of cellular genes, determined by next generation sequencing. Analysis of these deregulated genes identified multiple pathways including inflammasome to be affected due to ZIKV infection. Inflammasome activation was confirmed by quantitative PCR, where increased accumulation of NALP3, caspase 1, IL-1 and IL-18 transcripts were detected in ZIKV infected monocytes. Interestingly, the transcription of IFN α and IFN inducible genes (MxA and CXCL10) were not affected in ZIKV infected monocytes, suggesting that virus prevents activation of innate antiviral defense. However, most intriguing observation was that inhibition of inflammasome led to an increased transcriptional activity of IFN α , MxA and CXCL10. Based on these results we conclude that ZIKV replication depends on inflammasome activation.

SEROLOGICAL ACTIVITY OF VARIOUS COMPONENTS OF THE RABIES VIRUS ANTIGEN

Efimova M.A.¹, Khaertynov K.S.², Avzalova A.F.¹, Chernov A.N.², Akhmadeev R.M.¹, Nasirov Sh.M.¹, Nikitin A.I.¹

¹Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia
²Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

Summary: the article presents the results of the study the polypeptide profile of the rabies virus, its protein components, the dominant antigens identified were studied for their serological activity by ELISA and immunoblotting

Key words: rabies virus, ELISA, immunoblot, a serological activity

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ АНТИГЕНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Ефимова М.А.¹, Хаертынов К.С.², Авзалова А.Ф.¹, Чернов А.Н.¹, Ахмадеев Р.М.¹, Насыров Ш.М.¹, Никитин А.И.¹

¹ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань, Россия

²КГМА - филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань, Россия

Резюме: В статье представлены результаты исследования полипептидного профиля вируса бешенства, его белковые составляющие, определены доминантные антигены, изучена их серологическая активность методом ИФА и иммуноблотинга

Ключевые слова: вирус бешенства, ИФА, иммуноблот, серологическая активность

Несмотря на значительный прогресс по борьбе с бешенством, этот зооантропоноз продолжает оставаться чрезвычайно сложной проблемой для многих стран мира, в том числе и для Российской Федерации.

Основу мировых программ борьбы с бешенством составляет специфическая профилактика и своевременная диагностика с использованием современных лабораторных методов исследования. В настоящее время, практическое применение получили различные методы: биопроба на лабораторных животных, морфологическое исследование, метод иммунофлуоресценции, реакция преципитации в агаровом геле [Cliquet, F.et al. 2004].

Однако, все они в той или иной степени обладают значительными недостатками: низкая чувствительность, недостаточная специфичность, длительность получения результатов экспертиз и трудоемкость. В связи с этим, возрастает необходимость усовершенствования существующих и разработка ускоренных методов и эффективных средств диагностики этого зооноза [Е.В.

Чернышова и др. 2011; S.N.Madhusudana, et al. 2004].

Целью работы явилось поиск новых серологически активных и значимых антигенных препаратов при разработке средств диагностики бешенства и индикации его возбудителя на основе метода ИФА.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы вируса бешенства: «Овечий» ГНКИ, «CVS». Для наработки вирусного материала и титрации вируса использовали белых мышей живой массой 6-7г.

С целью выделения вируса, мозговую ткань подвергали дезинтеграции на приборе FastPrep-24. Концентрирование вируса проводили по плавучей плотности с использованием промежуточных стадий флотации на ультрацентрифуге Beckman. На каждом этапе очистки вируса бешенства проводили контроль при помощи аналитического электрофореза и иммуноблотинга для выявления локализации и серологической активности.

Электрофоретический профиль вируса бешенства изучали по Леммли. Методом иммуноблотинга (BIO-RAD) определяли серологическую активность вируса бешенства на модели гипериммунных сывороток, а также с использованием коллекции сывороток животных вакцинированных против бешенства.

Результаты и обсуждение. В результате ультрацентрифугирования концентрированного вируса бешенства в градиенте плотности сахарозы 10-50% (w/v) с шагом 10% было получено 4 фракции, из которых были изготовлены антигены для испытания в ИФА с положительными и отрицательными сыворотками кроликов.

Специфичность и активность различных стадий выделения вируса бешенства после заражения и накопления вирусной массы в мозговой ткани, очистки через градиент сахарозы проверяли в реакции иммуноблот, как наиболее информативного анализа.

Антиген полученный при ультрацентрифугировании (УЦФ-антиген) при 25 тыс. об/мин в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (15-25%) содержал все основные полипептиды вируса бешенства, однако при анализе осадка УЦФ антигена в ступенчатом градиенте сахарозы (40-45 %) установлено наличие дополнительно двух фракций полипептидов с молекулярной массой в области от 30 до 45 кДа, а при исследовании, осадка УЦФ антигена вируса бешенства после разделения в градиенте сахарозы, выявляли лишь 2 минорные фракции полипептидов в области 45-66,7 кДа. При обработке вируса бешенства на FastPrep не смогли получить четкой картины разделения полипептидов. Характерная картина разделения антирабической вакцины «Щелково-51» полученной на культуре клеток, установлена в 12,5 % ПААГ. При этом обнаруживали 2 мажорные фракции и 8 минорных фракций полипептидов. При анализе сыворотки крови полученных при иммунизации кроликов с использованием антирабической вакцины «Щелково-51» в иммуноблоте установлено, что на все выявленные полипептиды вырабатываются соответствующие специфические антитела.

При анализе положительных антирабических УЦФ-антигенов полученных в ступенчатом градиенте сахарозы (15-50%) с положительными

антирабическими овечьими глобулинами наибольшая степень очистки установлена в градиенте сахарозы (15-20%). При этом выявляли до 5 антигенных фракций. Наилучшее разделение белков по полипептидному профилю из предложенных методов установлено при центрифугировании на MiniSpin при 3000 об/мин без предварительной обработки вируса бешенства на FastPrep.

В результате проведенных исследований изучена серологическая активность полученных антирабических сывороток и глобулинов в ИФА. Разработаны оптимальные методы получения и очистки антигенов, а также глобулинов. Результаты исследований положены в основу усовершенствования технологии изготовления наборов по диагностике бешенства на основе ИФА и иммуноблотинга.

SECRETED AND CELL WALL ANTIGENS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FOR EVALUATION OF SPECIFIC HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY

Shuralev E.A.^{1,2}, Mukminov M.N.^{1,2},
Khaertynov K.S.¹, Singh M.³

¹ – Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

² – Kazan Federal University, Kazan, Russia

³ – Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH, Braunschweig, Germany

This study was conducted in the Republic of Tatarstan, Russian Federation, in 2014-2016. Blood serum samples were collected from patients with confirmed TB status (Mantoux test, chest X-ray) and potentially healthy people.

Humoral immunity was evaluated using two types of lateral-flow test (Lionex): LFtest-1 for detection of human IgG and IgM and LFtest-2 for detection of human IgA against *M.tuberculosis* antigens. Each test has two lines with specific recombinant antigens (line 1) and cell wall antigen (line 2). Cellular immunity was evaluated using two types of ELISPOT test (Lionex): LioSpot-1 and LioSpot-2 for detection the presence of antigen-specific lymphocytes by measure release of IFN- γ and IL-2 cytokines respectively in PBMCs stimulated with three types of recombinant and cell wall antigens (A, B and C) of *M.tuberculosis*.

Total 8/100 potentially healthy people reacted positive in lateral-flow tests. 1/100 was positive in LFtest-1 with only line 1 and 6/100 only with line 2. 1/100 was positive only in LFtest-2 with line 1. It was determined that the specificity for LFtest-1 line 1 – 99.00% and for line 2 – 94.00%, for LFtest-2 line 1 – 99.00% and for line 2 – 100.00%.

HIV status might effect on antibody production. Therefore sensitivity was calculated according to HIV status of patients. In this study 14/92 patients had positive HIV status, 78/92 patients had negative HIV status. None of these 14 patients reacted positive in LFtest-2. 9/14 patients were positive in LFtest-1: 3/14 in both line

1 and line 2, 5/14 in only line 1, and 1/14 in only line 2. Sensitivity of LFtest-1 for TB-HIV patients was determined as 64.29%.

6/78 TB confirmed (HIV negative) patients were positive in LFtest-2: 1/78 – with line 1, and 5/78 – with line 2. Sensitivity of LFtest-2 determined as 6.38%. 75/78 patients were positive in LFtest-1: 39/78 in both line 1 and line 2, 47/78 in only line 1, and 67/78 in only line 2. Sensitivity of LFtest-1 determined as 96.15%.

Cellular immunity was also depending on which antigens have been used. Using LioSpot-1 the presence of antigen-specific lymphocytes was detected by measuring release of IFN- γ in PBMCs stimulated with two types of recombinant and cell wall antigens (B and C) of *M.tuberculosis*. The stimulation effect by antigen B only was observed in 11.11%, by antigen C only – 44.44% and by antigens B&C – 44.44%. Using LioSpot-2 the presence of antigen-specific lymphocytes was detected by measuring release of IL-2 in PBMCs stimulated with three types of recombinant and cell wall antigens (A, B and C) of *M.tuberculosis*. The stimulation effect by antigen A only was observed in 36.36%, by C only – 18.18%, by A&B – 18.18%, by B&C – 18.18%, and by A&B&C – 9.09%.

Conducted studies proved the importance of using different types of antigens to achieve high levels of sensitivity and specificity of diagnostic tests for tuberculosis. To detect specific antibodies and antigen-stimulated lymphocytes it is necessary to use secreted and cell wall antigens.

TIRAP AND TLR2 POLYMORPHISMS REDUCE THE RISK OF PULMONARY TUBERCULOSIS AMONG THE KAZAKHS

Tarabayeva A.¹, Bitanova E.¹, Abilbayeva A.¹, Amirbekov A.²

¹S. Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Kazakhstan

²B. Atchabarov Institute of applied and fundamental research, Almaty, Kazakhstan

Background. Tuberculosis (TB) remains a global threat with more than one third of the world's population infected with *Mycobacterium tuberculosis*. There are a lot of factors playing a decisive role in the clinical manifestation of infections such as environmental risks, the pathogen's virulence, as well as the immune status of the host. The spread of multi-drug resistant *M. tuberculosis* strains and the current lack of an efficient vaccine underline the need for a better understanding of relevant host-pathogen interactions. Some evidence suggests that genetic factors of immune system may be important determinants of increased susceptibility to progressive disease development. Variations of innate immunity genes including the toll-like receptor (TLR) family have frequently been studying in TB. At the same time, there is a lack of information about the genetic markers of tuberculosis risk for the Kazakh ethnic group.

Methodology/Principal Findings. Polymorphisms of some proteins of TLRs family related to tuberculosis in accordance with data NCBI was analyzed.

We have researched TLR2 rs5743708, 2258G>A (p.Arg753Gln) and TIRAP rs8177374, 539C>T (p.Ser180Leu) in case-control study. There were 171 diagnosed pulmonary TB cases and 196 healthy controls without evidence of active TB and history of TB. All surveyed persons belonged to the Kazakh ethnic group. Persons born from mixed ethnic marriages were excluded from the survey.

Genotyping of polymorphisms was performed by amplification refractory mutation system multi-gene/multi-primer polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism. All data were analyzed by using Epi-Info software version 3.3. To test the effect of rs5743708 and rs8177374 on the risk of tuberculosis among the Kazakhs the odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CIs) were estimated.

The frequency of TLR2 rs5743708 was 21,9% in the control compared with 13.5% in patients group (OR (95% CI) = 0,55 (0,32-0,96), P=0,03). The proportion of monozygous genotype in control group was 19,4 % while in pulmonary TB patients, it was 7,6% (OR (95% CI) = 0,34 (0,16-0,66), P=0,0016). The frequency of TIRAP rs8177374 was 21,3% in the control compared with 12.8% in patients group (OR (95% CI) = 0,4 (0,23-0,72)). The proportion of monozygous genotype in control group was 24,1% while in pulmonary TB patients, it was 3,0% (OR (95% CI) = 0,13 (0,05-0,33)). Thus a protective effect TIRAP rs8177374 and TLR2 rs5743708 were revealed.

The combination of polymorphisms TIRAP/TLR2 occurred in 2,4% of patients and in 7,2% of healthy individuals (OR (95% CI) = 0,32 (0,11-0,90), P=0,03).

Conclusion. At present, we suggest that TLR2 rs5743708 and TIRAP rs8177374 gene may be protective in the development of tuberculosis among the Kazakhs.

Keywords: Toll-like receptors, Polymorphism, Tuberculosis

TUBERCULOSIS IN KAZAKHSTAN: CURRENT CHALLENGES

Bitanova E., Tarabayeva A., Rakisheva A., Nazhmedenova A.

S. Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Kazakhstan

In the Republic of Kazakhstan there have been significant advances in the fight against the tuberculosis epidemic. Despite this, it currently faces the problem of relatively high incidence with a significant proportion of multidrug-resistant. Up to the present time has not been studied immunogenetic features of the Kazakh population in various forms of tuberculosis, including MDR. A group of researchers from Almaty initiated a study to identify protective and predisposing SNP in genes of the innate immune factor.

Key words: tuberculosis, morbidity, multiresistente, SNP, factors of innate immunity

Tuberculosis in the Republic of Kazakhstan (RK) is still the most important health problem. There have been some successes - over the past 10 years the

incidence of tuberculosis in the country has declined by more than 2.2 times, and the death rate by 5 times. According to the report of the World Economic Forum on Global Competitiveness 2015-2016, according to the factor "Tuberculosis incidence", in 2016 Kazakhstan took 92nd place, having risen by 9 positions in comparison with 2015 [1, 2, 3].

At the same time, the tuberculosis of the 21st century presents us with new challenges. The indicator of primary drug resistance in Kazakhstan is 23.8%. With this indicator, we remain the number of 18 countries in the WHO European Region with a high level of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) [1]. The introduction of an accelerated molecular genetic method for diagnosing the drug resistance of mycobacterial tuberculosis recommended by WHO (Xpert MTB / RIF) may be one of the objective reasons for the high level of diagnosed MDR TB in the country. To date, all bacteriological laboratories of anti-tuberculosis organizations in the Republic of Kazakhstan have been provided with modern bacteriological equipment for the accelerated diagnosis of tuberculosis and multidrug-resistant tuberculosis. Genetic peculiarities of mycobacterium strains widespread in Kazakhstan, including multi- and widely-resistant strains, have been studied quite a long time in scientific centers of the country [4]. However, the question of participation of mechanisms of resistance of a macroorganism in the formation of this problem remains open. In this regard, the Department of Immunology of KazNMU in 2016 began work on a project whose goal is to identify SNP genes of the factors of congenital immunity of the protective or, on the contrary, contribute to the development of tuberculosis, including its MDR forms.

The material for the study was collected in profile clinics in Almaty. The study group consisted of 171 patients with tuberculosis, including: 74.3% with MDR. 95.5% of the patients had infiltrative, and 2.3% had fibrous-cavernous forms of tuberculosis. In 25% of patients there was a relapse of the disease, and in 20.5% there was an ineffectiveness of treatment against tuberculosis. Thus, the range of problems that currently exists in the Republic of Kazakhstan on tuberculosis, which requires a comprehensive analysis and in-depth study of their immunogenetic aspects, was identified.

Literature:

1. Statistical review of tuberculosis in the Republic of Kazakhstan, Almaty, 2016;
2. Ismailov Zh.K. Berikova EA, Ismailov Sh.Sh. Integrated model of tuberculosis control in Kazakhstan for 2016-2025. Phthisiopulmonology. - 2016, No. 1 (27). - p.4-11;
3. Ismailov Zh.K. Berikova E.A. Dzhazybekova P.M. Evaluation of the effectiveness of anti-tuberculosis activities at the end of 2015 // Zh. Phthisiopulmonology. - 2016, No. 1 (27). - p.11-15.
4. Kozhamkulov U.A. Molecular-genetic approaches to the study of infectious diseases / Laboratory medicine.-No. 2 (17), 2016.

Key words: Kazakhstan, tuberculosis, morbidity, multidrug resistance, SNP, factors of congenital immunity.

ТУБЕРКУЛЁЗ В КАЗАХСТАНЕ – СОВРЕМЕННЫЕ ВЫЗОВЫ

Битанова Э.Ж., Тарабаева А.С.,
Ракишева А.С., Нажмеденова А.Г.

Казахский Национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова

Туберкулез в Республике Казахстан (РК) до настоящего времени остается важнейшей проблемой здравоохранения. Достигнуты определённые успехи - за последние 10 лет уровень заболеваемости туберкулезом в стране снизился более чем в 2,2 раза, а смертности в 5 раз. Согласно отчету Всемирного Экономического Форума о Глобальной конкурентоспособности на 2015-2016 годы, по фактору "Распространенность туберкулеза" (Tuberculosis incidence) Казахстан в 2016 году занял 92 место, поднявшись на 9 позиций по сравнению с 2015 годом [1, 2, 3].

В то же время туберкулёз 21 века предъявляет нам новые вызовы - Казахстан с показателем первичной лекарственной устойчивости - 23,8% продолжает оставаться в числе 18 стран Европейского региона ВОЗ с высоким уровнем туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ)[1]. Внедрение ускоренного молекулярно-генетического метода диагностики лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, рекомендованной ВОЗ (Xpert MTB/RIF), возможно, является одной из объективных причин высокого уровня диагностируемого в стране МЛУ ТБ. На сегодняшний день в РК все бактериологические лаборатории противотуберкулезных организаций обеспечены современным бактериологическим оборудованием для ускоренной диагностики туберкулеза и туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью.

Генетические особенности распространенных в Казахстане штаммов микобактерии, в том числе мульти- и широкорезистентных изучаются в отечественных научных центрах[4]. Однако, открытым остаётся вопрос об участии механизмов резистентности макроорганизма в формировании данной проблемы. В этой связи кафедра иммунологии КазНМУ в 2016 году начала работу над проектом, целью которого является выявление SNP генов факторов врождённого иммунитета протективных или же, наоборот, способствующих развитию туберкулёза, в том числе его МЛУ форм.

Материал для исследования собирался в профильных клиниках города Алматы. Группу исследования составили 171 казахов больных туберкулёзом, из них: 74,3% - с МЛУ. 95,5% исследованных имели инфильтративную, 2,3%-фиброзно-кавернозную формы туберкулёза. У 25% больных был рецидив заболевания, а у 20,5% была констатирована неэффективность лечения против туберкулёза. Таким образом, был выявлен спектр проблем, сложившийся в настоящее время в РК по туберкулёзу, требующий всестороннего анализа и углубленного изучения их иммуногенетических аспектов.

Литература:

1. Статистический обзор по туберкулезу в Республике Казахстан, Алматы, 2016;
2. Исмаилов Ж.К. Берикова Э.А. Исмаилов Ш.Ш. Интегрированная модель контроля туберкулеза в Казахстане на 2016-2025 годы //Ж. Фтизиопульмонология. – 2016, № 1(27). - С.4-11;
3. Исмаилов Ж.К. Берикова Э.А. Джазыбекова П.М. Оценка эффективности противотуберкулезных мероприятий по итогам 2015 года //Ж. Фтизиопульмонология. – 2016, № 1(27). - С.11-15.
4. Кожамкулов У.А. с соавт. Молекулярно-генетические подходы изучения инфекционных заболеваний/Лабораторная медицина.-№2(17), 2016г.

Ключевые слова: туберкулёз, заболеваемость, мультирезистентность, SNP, факторы врождённого иммунитета

ИНТОКСИКАЦИЯ КАДМИЕМ ПОДАВЛЯЕТ СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Валеева А.Р.

КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань, Россия

Высокая заболеваемость туберкулезом человека и животных обусловлена способностью микобактерий сохранять жизнеспособность под действием внешних неблагоприятных факторов. Ослабление иммунных реакций и иммунодефициты приводят к развитию диссеминированных форм и патологических процессов, вызванных как микобактериями МТВ complex, так и атипичными.

Соединения кадмия увеличивают восприимчивость к внутриклеточным патогенам, оказывают влияние на резистентность организма к инфекционным заболеваниям сам возбудитель, усугубляют патогенез. Ионы Cd образуют комплексы с иммунокомпетентными клетками и белками, угнетают клеточный иммунный ответ и в тоже время активируют гуморальное звено.

Цель: оценить влияние хронической кадмиевой интоксикации на специфический иммунитет в динамике патогенеза туберкулеза.

В качестве модельных животных использовали кроликов весом 3-3,5 кг. Водный раствор CdCl₂ (ГОСТ 4330-66) вводили кроликам 1-ой и 3-ей групп в желудок в дозе 1,5 мг на кг живого веса при помощи тонкого эластичного зонда. Через 14 суток после 1-го введения CdCl₂ кроликам 2-ой и 3-ей групп, подкожно в области правого бедра вводили 1 мл суспензии, содержащей 1 миллиард живых клеток *M.bovis* Bovinus-8 в стерильном физиологическом растворе. В работе использовали шестинедельную культуру штамма *M.bovis* Bovinus-8, предоставленного ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко (ВИЭВ), выращенную на плотной питательной среде

Левенштейна-Йенсена, приготовленной по классическому рецепту в лаборатории. В день перед инфицированием, а также на 7, 14, 21, 28, 42 сутки после, у животных брали кровь по стандартной методике. Для определения уровня антител в сыворотке крови использовали оптимизированный метод ИФА с применением гипериммунных сывороток против *M.bovis* Bovinus-8. В качестве антигенов для серологических исследований использовали экстракт клеток *M.bovis* Bovinus-8 и их вторичные метаболиты, выделенные из супернатанта при экстракции.

В результате ИФА выявили, что у животных 2-ой группы (инфицированных *M.bovis* Bovinus-8), антителогенез проявлялся, начиная с 14-28 сут после инфицирования. Оптическая плотность 5-7-кратно превышала показатели животных до инфицирования и интактных при использовании в качестве антигена экстракта клеток и не более чем в 4 раза при использовании вторичных метаболитов. При этом уровень антител в сыворотке крови был стабилен до конца срока наблюдения, оптическая плотность достигала 1,177 и 0,238 ОЕ для указанных антигенов соответственно. У кроликов, инфицированных на фоне интоксикации (3-я группа), специфические антитела обнаруживались только на 28-42 сут. При этом значения оптической плотности превышали показатели у данных животных до инфицирования не более чем в 3 раза и достигали 0,947 ОЕ для экстракта клеток *M.bovis* Bovinus-8 и 0,221 ОЕ для их вторичных метаболитов. Показатели оптической плотности у животных 1-ой и 4-ой групп во все сроки исследования находились на уровне 0,111-0,179 ОЕ и 0,055-0,078 ОЕ для указанных антигенов соответственно, что являлось общим фоном реакции.

Таким образом, хроническая интоксикация $CdCl_2$ вызвала угнетение специфического иммунного ответа организма кроликов, что проявлялось в более поздних сроках начала антителогенеза и низком уровне антител в сыворотке крови животных, инфицированных на фоне интоксикации.

ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК МИКОБАКТЕРИЙ В ПОМЕЩЕНИИ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАРАЖЕНИЯ ЖИВОТНЫХ ДО И ПОСЛЕ ДЕЗИНФЕКЦИИ

Хаммадов Н.И., Осянин К.А.

ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань, Россия

Введение. В данной работе мы исследовали помещение (20 м²), для экспериментального инфицирования животных микобактериями, на предмет наличия в нём бактерий рода *Mycobacterium*, в том числе бактерий группы *Mycobacterium tuberculosis complex* (МТВ complex).

Целью работы было сравнение количества выявляемых ДНК микобактерий на различных поверхностях помещения до и после дезинфекции.

Задачи:

1. выявить специфичные локусы ДНК для индикации исследуемых микроорганизмов
2. произвести дизайн праймеров и зондов для ПЦР на основе подобранных специфичных локусов
3. отобрать и исследовать пробы на наличие искомым ДНК микобактерий (до и после проведения мероприятий по дезинфекции исследуемого помещения)

Ключевые слова: Туберкулёз, микобактерии, дизайн праймеров, амплификация, дезинфекция и очистка объектов помещения

Результаты и обсуждение

Для работы были подобраны локусы для индикации представителей рода *Mycobacterium*, микобактерий группы *MTB complex*, микобактерий вида *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium bovis BCG*. Проверку специфичности последовательностей и дизайн праймеров (зондов) осуществляли аналогично применяемой нами методике [1].

Для исследования отбирались пробы с различных объектов лабораторного помещения. Результат ПЦР по индикации в исследуемых образцах (до дезинфекции) ДНК различных микобактерий указывает на их присутствие на всех поверхностях помещения, кроме из раковины и лабораторного шкафа. Однако не во всех случаях речь идет о *MTB complex*, соскобы с хоз. инвентаря, подоконника и вытяжки положительно реагировали лишь с праймерами для индикации бактерий рода *Mycobacterium*. ДНК *Mycobacterium bovis* обнаруживалась в кормушках, на полу, на стенках клеток и на поверхности двери, все выявленные образцы *Mycobacterium bovis* идентифицировались как вакцинный штамм (*Mycobacterium bovis BCG*). ДНК *Mycobacterium tuberculosis* в анализируемых образцах не выявлена.

После дезинфекции была повторно проведена ПЦР, по результатам которой в образцах с раковины, кормушек, хоз. инвентаря, пола, подоконника и шкафа ДНК микобактерий группы *MTB complex* обнаружено не было. В других пробах индикация микобактерий происходила с более поздним стартом ПЦР.

Отобранные пробы (после дезинфекции) были посеяны на питательные среды «Левенштейна-Йенсена» и «ВАСТЕСТМ Мусо F Lytic», пророста микобактерий на питательных средах не обнаружено.

Выводы. Во время экспериментального течения туберкулёза лабораторных животных происходит активное распределение микобактерий по всем объектам помещения, об этом свидетельствует наличие ДНК микобактерий на поверхности раковины, кормушек, подоконнике и не только.

Среди указанных проб ДНК микобактерии группы *MTB complex* (*Mycobacterium bovis BCG*) обнаружены на стенках клеток для содержания животных (две пробы из трех), на столе для хозяйственных нужд (одна проба из двух) и на двери (одна проба).

Заключение. Кроме микобактерий, которыми заражали лабораторных животных (*Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis*), в помещении присутствуют и сапрофитные микобактерии, не принадлежавшие к группе

МТВ-complex, наиболее вероятным источником их появления являются корма для лабораторных животных.

При дезинфекции лабораторных помещений необходимо в равной степени уделять внимание всем объектам помещения (подоконник, вентиляция...) так как без должного внимания они могут стать не учтенным фактором передачи инфекционного агента и привести к ложным результатам эксперимента.

Литература

1. Ндайишимийе Э.В. Хаммадов Н.И. Осянин К.А. (2015) и др. Биоинформационный анализ олигонуклеотидов для молекулярно-генетической индикации возбудителей аспергиллеза и аскосфероза пчел, Ветеринарный врач, № 2. С. 3-9.

ADHESION OF TOXOPLASMA GONDII TACHYZOITE-INFECTED VEHICLE LEUKOCYTES TO CAPILLARY ENDOTHELIAL CELLS TRIGGERS TIMELY PARASITE EGRESSION

Takashima Ya.

Gifu University, Japan

Intracellular pathogens have numerous strategies for effective dissemination within the host. Many intracellular pathogens first infect leukocytes, which they use as a vehicle to transport them to target organs. Once at the target organ, intracellular parasite *Toxoplasma gondii* can cross the capillary wall in extracellular form by infecting endothelial cells. However, after egression from leukocytes, extracellular parasites face the risk of host immune attack. In this study, observation of infected mouse organs, using a method that renders tissue transparent, revealed that adhesion of tachyzoite-infected leukocytes to endothelial cells triggers immediate egression of the parasite. This signal enables the parasite to time egression from its vehicle leukocyte to coincide with arrival at a target organ, minimizing the opportunity for immune attack during the transition from a vehicle leukocyte to capillary endothelial cells.

CLINICAL FEATURES OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME CAUSED BY GENOTYPE HANTAVIRUSES PUUMALA, CIRCULATING IN THE REPUBLIC OF TATARSTAN

Shakirova V.G.¹, Davidyuk Y.N.¹, Kabwe E.², Martynova E.V.¹,
Ismagilova R.K.¹, Morzunov S.P.³, Khaertynova I.M.²,
Khaiboullina S.F.^{1,3}, Rizvanov A.A.¹

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Kazan state medical academy, Kazan, Russia

³ University of Nevada, Reno, NV, USA

The Republic of Tatarstan (RT) is one of the most disadvantaged territories regarding the incidence of HFRS. In 2015 only, more than 1000 cases of HFRS were registered. Puumala virus is the causative agent of HFRS belonging to the genus Hantavirus, Bunyaviridae family. The rodent reservoir for Puumala virus is bank voles, *Myodes glareolus*. Published data indicates the circulation of several PUUV strains in the populations of bank vole of the Volga region associated to the «Russian» genetic lineage. The goal of this study was to identify PUUV strains in the bank vole population and in the patients diagnosed with HFRS in the north-west part of the RT. Furthermore, the correlation between the clinical manifestations of HFRS and genetic characteristics of the virus strains were searched.

Total RNA was extracted from 133 lung tissue samples of bank vole trapped in spring and autumn 2015, and from whole blood samples of 76 patients diagnosed with HFRS cases established in 2015 treated at the clinical infectious diseases hospital in Kazan. Viral RNA in bank vole samples was detected by RT-PCR reaction, while viral RNA from patients was identified by RT-PCR reaction in a nested standard method. Amplicons were sequenced and the obtained partial sequences of S-segment were analyzed using the software package LaserGene (DNASTAR, USA).

Phylogenetic analysis of partial sequences 171 bp long of S-segment PUUV strains from 37 bank voles and 22 patients with HFRS showed two clades which correlated with genetic lineage «Russia» and «Finland». The genetic identity between sequences within «Russia» clade was 90,6-100,0%, comparison with PUUV strains of «Samara», «Kazan», «Udmurtia», «Bashkortostan» revealed – 90,6-98,2%. A comparability of sequences within «Finland» clade showed the level of identity 98,2-100,0% and 93,0-94,7% compared to «Konevessi» and «Pieksamaki» PUUV strains. Identity between the sequences from different clades was 83,0-84,8%. These results suggest the co-circulation of two distinct genetic lineages PUUV strains in the populations of the bank voles in the north-west region of the RT.

Of the 22 patients with HFRS were the viral RNA was detected in less than 20 days of infection. Sequence analysis revealed that 12 patients were infected with PUUV strains «Russia» genetic lineage (group 1) and 10-were found to be infected with PUUV strains «Finland» genetic lineage (group 2). No pre-existing conditions were found in all the patients however, all patients developed infectious-toxic

syndrome in the form of headache, weakness and fever. The first group (group 1) 41.7% and the second group (group 2) 40.0% developed respiratory syndrome ($P>0.05$), abdominal pain, nausea, vomiting, loose stool occurred in 58.3 % and 30.0% patients, respectively ($p>0.05$). Diuresis decreased in 75.0% and 30.0% patients, respectively ($p>0.05$).

Many significant differences in the clinical picture of patients were revealed: visual impairment in the form of a «fog» was seen before the eyes only in patients of the 1st group (33.3%, $p<0.05$), pains in the lumbar region in the 1st group were found in 91, 7% of patients and only in 50.0% - in the second group ($p<0.05$). The laboratory parameters levels differed between the patients, the patients of the 1st group had significantly lower platelet counts ($72.16 \pm 42.07 \times 10^9 / l$ and $131.00 \pm 46.54 \times 10^9 / L$, $p < 0.05$) and high AST level ($50.83 \pm 26.92 U / l$ and $31.60 \pm 11.91 U / l$, $p<0.05$).

To conclude, PUUV strains genetic lineage of «Russia» and «Finland» were found to be circulating in the local bank voles population and patients with HFRS in the north-west region of the RT. Patients infected with strains of the «Russia» genetic lineage are significantly more likely to have pain in the lumbar region, visual impairment in the form of «fog» in front of the eyes, and lower platelet counts and a high level of AST than those infected with strains of the «Finland» genetic lineage.

КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ, СВЯЗАННЫЕ С ГЕНОТИПОМ ШТАММОВ ХАНТАВИРУСА PUUMALA, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

Шакирова В.Г.², Давидюк Ю.Н.¹, Кабве Э.¹, Мартынова Е.В.¹, Исмагилова Р.К.¹, Хаертынова И.М.², Хайбуллина С.Ф.^{1,3}, Морзунов С.П.³, Ризванов А. А.¹

¹ ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, Россия

² КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань, Россия

³ Университет Невады, Рино, США

Республика Татарстан (РТ) относится к регионам России с высоким уровнем заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС). Так, в 2015 г. в РТ было диагностировано более 1000 случаев ГЛПС. Возбудителем заболевания является вирус Puumala (PUUV) – род Hantavirus, семейство Bunyaviridae, – а основным природным носителем вируса выступает рыжая полёвка *Myodes glareolus*. Литературные данные свидетельствуют о циркуляции в популяциях рыжей полёвки Поволжья нескольких штаммов PUUV, принадлежащих к генетической линии «Россия». Целью исследования была идентификация штаммов PUUV в популяциях рыжей полёвки и у больных ГЛПС в северо-западных районах РТ и поиск зависимости между клиническими проявлениями ГЛПС и генетическими особенностями штаммов вируса. Общую РНК выделяли из лёгочной ткани 133 рыжих полёвок,

отловленных весной и осенью 2015 г. и из крови 76 больных с поставленным в 2015 г. диагнозом ГЛПС, находившихся на стационарном лечении в республиканской клинической инфекционной больнице г. Казани. Выявление вирусной РНК в образцах рыжей полёвки проводили методом ОТ-ПЦР, в образцах больных ГЛПС – методом ОТ с последующей nested-ПЦР. Продукты амплификации участка S-сегмента PUUV секвенировали и полученные сиквенсы анализировали с помощью пакета программ LaserGene (DNASTAR, США).

Результаты филогенетического анализа сиквенсов участка S-сегмента длиной 171 пн показали, что обнаруженные штаммы PUUV (37 – у полёвки и 22 – у больных ГЛПС) группируются в две клады, которые можно соотнести с генетическими линиями «Россия» и «Финляндия». Идентичность сиквенсов в кладе «Россия» при сравнении между собой составила 90,6-100,0%, при сравнении со штаммами «Самара», «Казань», «Удмуртия», «Башкирия» – 90,6-98,2%. В кладе «Финляндия» сиквенсы идентичны на 98,2-100,0% друг другу и на 93,0-94,7% – штаммам «Коневетси» и «Пиексамаки». Идентичность штаммов из разных клад находилась в пределах 83,0-84,8%. Полученные данные свидетельствуют о ко-циркуляции штаммов PUUV, принадлежащих к двум генетическим линиям, в популяциях рыжей полёвки на территории северо-западных районов РТ.

Из 22 пациентов, у которых не позже 20-го дня болезни была обнаружена РНК PUUV, 12 были инфицированы штаммами генетической линии «Россия» (группа 1), 10 – генетической линии «Финляндия» (группа 2). При анализе клинической картины выявлено, что у всех больных формировался инфекционно-токсический синдром в виде головной боли, слабости, лихорадки. У 41,7% пациентов 1-ой группы и у 40,0% 2-ой группы отмечался респираторный синдром ($p > 0,05$), абдоминальный синдром в виде болей в животе, тошноты, рвоты, жидкого стула встречался у 58,3% и 30,0% соответственно ($p > 0,05$), снижение диуреза – у 75,0% и 30,0% соответственно ($p > 0,05$). Выявлены достоверные отличия в клинической картине: нарушение зрения в виде «тумана» перед глазами встречалось только у пациентов 1-ой группы (33,3%, $p < 0,05$), боли в поясничной области в 1-ой группе встречались у 91,7% больных и лишь у 50,0% – во 2-ой группе ($p < 0,05$). При исследовании лабораторных показателей у пациентов 1-ой группы отмечался достоверно более низкий уровень тромбоцитов ($72,16 \pm 42,07 \times 10^9/\text{л}$ и $131,00 \pm 46,54 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$) и более высокий уровень АСТ ($50,83 \pm 26,92$ Ед/л и $31,60 \pm 11,91$ Ед/л, $p < 0,05$).

Выводы. В популяции рыжей полёвки и у больных ГЛПС северо-западных районов РТ выявлены штаммы PUUV, принадлежащие к генетическим линиям «Россия» и «Финляндия». У пациентов, инфицированных штаммами линии «Россия», достоверно чаще отмечаются боли в поясничной области, нарушение зрения в виде «тумана» перед глазами, а также выявлены более низкий уровень тромбоцитов и более высокий уровень АСТ по сравнению с пациентами, инфицированными штаммами линии «Финляндия».

SERUM CYTOKINE PROFILES DIFFERENTIATING HFRS AND HPS

Khaiboullina S.F.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Hantavirus infection clinically manifests as hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and hantavirus pulmonary syndrome (HPS). HFRS is endemic in Europe and Russia, where the mild form of the disease, referred as nephropathia epidemics (NE), is prevalent in the Tatarstan region. HPS is endemic in Argentina, as well as other countries of North and South American. Infection is usually acquired via inhalation of virus-contaminated aerosol. Pathogenesis of NE and HPS is largely unknown; however endothelial cells are identified as the primary target of infection, where lack of the cell damage due to virus replication has been documented. Therefore, it has been suggested that a “cytokine storm” may play a crucial role in the diseases pathogenesis.

To identify potential serological markers that distinguish NE and HPS, 48 analytes were analyzed in serum samples collected during early and late phases of the disease using multiplex magnetic bead-based assays.

Overall, serum cytokine profiles associated with HPS revealed a more inflammatory milieu as compared to NE. Furthermore, HPS was characterized by the upregulation of cytokine levels, in contrast to NE which was distinguished by a dichotomy in serum cytokine levels. HPS was also characterized by the upregulation of a higher number of cytokines than NE (40 vs. 21). Additionally a distinct cytokine profiles were identified in HPS and NE. These profiles suggest a strong activation of an innate immune and inflammatory responses are associated with HPS, relative to NE, as well as a robust activation of Th1-type immune responses. The results of our analysis suggest that serum cytokines profiles of HPS and NE cases are consistent with the presence of extracellular matrix degradation, increased mononuclear leukocyte proliferation and transendothelial migration.

EXPERIENCE OF TREATMENT BY PARITAPREVIR/OMBITASVIR/RITONAVIR AND DASABUVIR OF PATIENTS WITH LIVER CIRRHOSIS IN THE OUTCOME OF CHRONIC VIRAL HEPATITIS C

Khaertynova I.M.¹, Gaifullina E.G.¹, Sozinova Y.M.²

¹ Kazan state medical academy - branch of RMANPO, Kazan

² Republican Clinical Infectious Diseases Hospital, Kazan

Objective: To evaluate the efficacy and safety of therapy by paritaprevir / ombitasvir / ritonavir and dasabuvir of patients with hepatic cirrhosis (HC) in the outcome of chronic viral hepatitis C (HCV).

Materials and methods. Was examined a group of patients from 12 people aged 38 to 74 years, including 5 men and 7 women. The diagnosis of HCV was established by PCR method with the determination of HCV RNA in quantitative form. Liver cirrhosis was diagnosed by clinical examination, ultrasound of the abdominal organs, liver elastometry on the "Fibroscan", and the severity of the HC by the Child-Pugh scale. The duration of antiviral therapy (AVT) was 12 weeks with clinical and laboratory examination at 4, 8 and 12 weeks of treatment and at 12, 24 weeks after completion of AVT.

Results. All patients were infected with the 1b genotype of HCV. Initially, 9 (75%) patients had a low viral load of HCV RNA. An equal number – 6 patients had a Class A and a Class B HC. Before the start of therapy, the average ALT level was 138.7 ± 37.8 IU/ml, PSI - $73.7 \pm 2.6\%$, albumins - $35.2 \pm 1, 2$ g/l, platelets - $86,9 \pm 12,2 \cdot 10^9$ /l. Virological response (VR), as undetectable HCV RNA, was obtained for 8 patients (66.7%) from 4 weeks of treatment and for 4 patients (33.3%) from 8 weeks of treatment. A stable virologic response (SVR) at 12 weeks after completion of treatment was achieved for 8 patients, including 6 patients at 24th week of treatment, which was 100% of those who had undergone these observation period. In addition, a biochemical response was obtained as normalization of ALT to an average of 28.6 ± 2.4 IU/ml by week 8 of treatment. Among the adverse events (AE) during antiviral therapy (AVT), weakness was most commonly seen – 3 patients, and also in 2 cases were noted headache, tachycardia, dry cough and skin itching. From hematological AE in 4 cases was noted thrombocytopenia was less than $50 \cdot 10^9$ /l and in 1 caset hyperbilirubinemia more than $35 \mu\text{mol/l}$.

Conclusions. Antiviral therapy with paritaprevir/ombitasvir/ritonavir and dasabuwir showed high efficacy for patients with class A and B liver cirrhosis: all patients showed virological response (VR) at week 8 and at the end of therapy, in 8 (100%) at 12 weeks and 6 (100%) at 24 weeks after completion of treatment. In general, there was noted satisfactory tolerability, during the treatment serious adverse events were not registered, and the observed AE did not require early termination of treatment.

ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕПАРАТАМИ ПАРИТАПРЕВИР/ОМБИТАСВИР/РИТОНАВИР И ДАСАБУВИР У ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ В ИСХОДЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

Хаертынова И.М.¹, Гайфуллина Э.Г.¹, Созинова Ю.М.²

¹ КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань, Россия

² Республиканская клиническая инфекционная больница, Казань, Россия

Цель: оценить эффективность и безопасность терапии препаратами паритапревир/ омбитасвир/ритонавир и дасабувир у пациентов с циррозом печени (ЦП) в исходе хронического вирусного гепатита С (ХГС).

Материалы и методы. Обследована группа пациентов из 12 человек в возрасте от 38 до 74 лет, из них 5 мужчин и 7 женщин. Диагноз ХГС устанавливался методом ПЦР с определением РНК вируса гепатита С (ВГС) в количественном варианте. Цирроз печени диагностировали по данным клинического обследования, результатам УЗИ органов брюшной полости, эластометрии печени на аппарате «Фиброскан», степень тяжести ЦП по шкале Чайлд-Пью. Длительность противовирусной терапии (ПВТ) составила 12 недель с клинико-лабораторным обследованием на 4, 8 и 12 неделях лечения и 12, 24 неделях после завершения ПВТ.

Результаты. Все пациенты были инфицированы 1b генотипом ВГС. Исходно у 9 (75%) больных была низкая вирусная нагрузка РНК ВГС. Равное количество – по 6 пациентов имели ЦП класса А и класса В. До начала терапии средний уровень АЛТ составил $138,7 \pm 37,8$ МЕ/мл, ПТИ – $73,7 \pm 2,6\%$, альбуминов – $35,2 \pm 1,2$ г/л, тромбоцитов – $86,9 \pm 12,2 \cdot 10^9$ /л. Вирусологический ответ (ВО), как неопределяемая РНК ВГС, был получен у 8 (66,7%) пациентов с 4 недели лечения и у 4 (33,3%) с 8 недели лечения. Устойчивый вирусологический ответ (УВО) на 12 неделе после завершения лечения достигнут у 8 пациентов, в том числе у 6 на 24 неделе, что составило 100% из числа прошедших данные периоды наблюдения. Кроме того, был получен биохимический ответ как нормализация АЛТ в среднем до $28,6 \pm 2,4$ МЕ/мл к 8 неделе лечения. Из нежелательных явлений (НЯ) во время ПВТ чаще всего наблюдалась слабость – у 3 пациентов, а также по 2 случая развития головной боли, тахикардии, сухого кашля и кожного зуда. Из гематологических НЯ в 4 случаях отмечалась тромбоцитопения менее $50 \cdot 10^9$ /л и у 1 пациента гипербилирубинемия более 35 мкмоль/л.

Выводы. ПВТ паритапревиром/омбитасвиром/ритонавиром и дасабувиром показала высокую эффективность у пациентов с циррозом печени класса А и В: у всех пациентов получен ВО на 8 неделе и на момент окончания терапии, у 8 (100%) через 12 недель и у 6 (100%) через 24 недели после завершения лечения. В целом отмечалась удовлетворительная переносимость, за время терапии не были зарегистрированы серьезные нежелательные явления, а наблюдаемые нежелательные явления не потребовали досрочного завершения лечения.

MOLECULAR-GENETIC PRECEDERS OF RECURRENCE OF WOLVOVAGINAL CANDIDIASIS

Donnikov A.

Federal State Budget Institution "Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology" Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
Moscow, Russia

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a fungal infection of the vulva and vaginal mucosa and is a second frequent disease after bacterial vaginosis. In every 10th woman, the VVC becomes recurrent (4 or more episodes of exacerbation within 12 months), and every third patient has at least one relapse within the next 6 months upon first treatment for acute VVC.

Fungi of the *Candida* species are commensals, and are part of normal human microflora and often colonize the skin and mucous membranes. Yeast fungi can live in a wide pH value range and withstand deep acidification of the environment; therefore, VVC can occur both on the background of dysbiotic disorders as well as with preserved lactoflora. Because the clinical signs of vaginal dysbiosis and VVC are similar, it is often difficult to clearly determine what exactly causes vaginal discomfort. It was shown that the severity of vulvovaginitis symptoms correlates with the number of fungi in the vaginal microflora, and the number of fungi more than $Lg(4.5)$ GE / sample is a laboratory criterion of VVC with a specificity of 93%, but this is not a predictor of recurrence.

Predisposition to a recurrent vulvovaginal candidiasis is due to the peculiarities of the immune response and is genetically determined. VVC occurs on a background of a reduced immune response, and local immunity responds more intensively to excessive growth of opportunistic microflora than to fungi growth. Herewith, the dysbiotic disorders of the vaginal microflora are associated with a recurrence of VVC, which can also be a consequence of genetically caused disorders in the system of innate immunity.

Thus, an in-depth molecular-genetic study, involving not only the quantitative determination of yeast fungi, but also a detailed assessment of the structure of the vaginal microflora and the genotyping of the patient, is advisable to be carried out even in case of the first treatment for VVC. The detection of predisposition to recurrent VVC and the appointment of anti-relapse therapy to such patients allow to significantly increase the effectiveness of VVC treatment.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ РЕЦИДИВИРОВАНИЯ ВУЛЬВОВАГИНАЛЬНОГО КАНДИДОЗА

Донников А.

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Вульвовагинальный кандидоз (ВВК) представляет собой грибковое поражение вульвы и слизистой влагалища и занимает второе место после бактериального вагиноза. У каждой 10 женщины ВВК приобретает рецидивирующий характер (4 и более эпизодов обострения в течение 12 месяцев), а каждая третья пациентка при первом обращении по поводу острого ВВК имеет хотя бы один рецидив в последующие 6 месяцев.

Грибы рода *Candida* являются комменсалом, входят в состав нормальной микрофлоры человека и зачастую колонизируют кожу и слизистые оболочки. Дрожжевые грибы могут жить при широком значении рН и выдерживают глубокое закисление среды, поэтому, ВВК может протекать как на фоне дисбиотических нарушений, так и при сохраненной лактофлоре. Поскольку клинические признаки влагалищного дисбиоза и ВВК сходны, зачастую трудно однозначно определить, чем именно вызван влагалищный дискомфорт. Показано, что выраженность симптомов вульвовагинита коррелирует с количеством грибов в составе микрофлоры влагалища, и количество грибов более $Lg(4.5)$ ГЭ/образец является лабораторным критерием ВВК со специфичностью 93%, однако это не является предиктором рецидивирования.

Предрасположенность к рецидивирующему течению вульвовагинального кандидоза обусловлена особенностями иммунного ответа и генетически детерминирована. ВВК протекает на фоне сниженного иммунного ответа, а локальный иммунитет более интенсивно реагирует на чрезмерный рост условно- патогенной микрофлоры, чем на грибы. При этом дисбиотические нарушения микрофлоры влагалища ассоциировано с рецидивирующим течением ВВК, что может также быть следствием генетически обусловленных нарушений в системе врожденного иммунитета.

Таким образом, углубленное молекулярно-генетическое исследование, включающее не только количественное определение дрожжевых грибов, но и детальную оценку структуры микрофлоры влагалища и генотипирование пациентки, целесообразно проводить даже при первом обращении по поводу ВВК. Выявление предрасположенности к рецидивирующему течению ВВК и назначение таким пациенткам противорецидивной терапии позволяет существенно повысить эффективность лечения ВВК.

EFFICACY OF ANTI-RABIES VACCINE IN COMBINATION WITH XYMEDONEHYDROCHLORIDE IN RABBITS WITH INDUCED IMMUNOSUPPRESSION

Kalmykova Y., Akhmadeev R., Aleeva Z.,
Yarullina G., Chernov A., Efimova M.

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological
Safety, Kazan, Russia

Already the not alone generation of scientists is developed science and practice of study and fight against a zoonotic infection - hydrophobia. In spite of considerable achievements in this area, questions of providing of adequate immune answer for a vaccination with weak immune activity and with the displays of immunodeficit are actual.

To date in Russia for a prophylaxis and fight against hydrophobia conduct a routine vaccination [1] with the use of living and inactivated vaccines, but among animals there are individuals that does not react or poorly react on a vaccination, especially with the immunodeficiency state.

For the increase of efficiency of anti-rabies immunization the choice we stopped for xymedonehydrochloride - stimulator of regeneration fabrics.

The aim of the real work consisted of estimation of immune answer of the immunodepressive rabbit immunized by anti-rabies vaccine in combination with xymedonehydrochloride.

In experimental immunization of rabbit of breed « Chinchilla» by anti-rabies vaccine from the stamm of «Shchelkovo-51» on a background immunosuppression influence of xymedonehydrochloride is studied on the indexes of immune answer. A seroresponse was estimated by the method of indirect immunoenzyme analysis and in the reaction of neutralization, cellular - on the level of lymphocytes and albuminous profile.

Keywords: hydrophobia; vaccination; xymedonehydrochloride; immunosuppression; immunopotential; immune answer.

Researches showed that for animals with immunosuppression (immunity was repressed by single introduction of cyclophosphamide-LANCE, 50 mgs/animal), vaccinated doubly with an interval 10 days in combination with xymedonehydrochloride (5 mgs/of 1 kg of animal), in 1 month, there is a higher level of specific antibodies - 1: 12800 (group 1), as compared to control 2 by a group - 1: 6400. In an immunocompetency group 3 with single immunization the levels of antibodies were identical to the indexes of a 1 group. Specificity and protective level of antibodies estimated in the reaction of neutralization at the use of working dose of rhabdovirus 50LD₅₀ (10^{-1,95}) stamm « Sheep» VGNKI. High degree of defence (50% of survivor mise) at the maximal breeding of serums 1: 800 a group showed with xymedonehydrochloride. In a group 2 - 75% of survivor mise is got in breeding of serum 1: 400, that some below, than at stimulation, but more effective, than at a

single vaccination (1: 400/50%). Reference serum secured for 50% of the infected mice at breeding 1: 1600, that corresponds 20 ME/мл.

In 6 months of immunization rabbits of all groups were seronegative and did not have a protective level of antibodies. The increase of number of T - cells with suppressor activity, stipulating immunological tolerance as a result of that productive activity of the antigen-specific clone of lymphocytes went down considerably, is also reduced.

A positive dynamics on a general albumen in 1 month of immunization took place due to the increase of albumens and β -globulin (group 1), β -globulin (group 2), albumens and β -, γ -globulin (group 3). In 6 months amount of general albumen in groups 1 and 3 got around base-line values, and in a group 2 testimonies of general albumen were below than primary values, but remained within the limits of physiological norm.

The comparative analysis of the obtained experimental data showed that double anti-rabies immunization in combination with xymedonehydrochloride assisted stimulation of all links of the immune system and characterized by greater specificity of antiviral immunity [2].

Literature:

1. Atrohov S.V. (2016). Analysis of epizootic situation on hydrophobia in the Nizhniy Novgorod area. // Veterinary doctor, №3, P.21-24.

2. Losich M.A. (2011). Immunobiological properties of new vaccine of Rubiks / M.A. Losich, I.V. Nepoklonov, O.A. Verkhovsky of and other veterinary Science, №12, P. 17-20.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КСИМЕДОНГИДРОХЛОРИДА ПРИ АНТИРАБИЧЕСКОЙ ВАКЦИНАЦИИ КРОЛИКОВ НА ФОНЕ ИММУНОДЕПРЕССИИ

Калмыкова Ю.В., Ахмадеев Р.М., Алеева З.З.,
Яруллина Г.М., Ефимова М.А., Чернов А.Н.

ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань, Россия

Уже не одно поколение ученых развивают науку и практику изучения и борьбы с зоонозной инфекцией - бешенством. Несмотря на значительные достижения в этой области, вопросы обеспечения адекватного иммунного ответа на вакцинацию с ослабленной иммунной активностью и с проявлениями иммунодефицита являются актуальными.

На сегодняшний день в России для профилактики и борьбы с бешенством проводят плановую вакцинацию [1] с использованием живых и инактивированных вакцин, но среди животных встречаются особи, которые не реагируют или слабо реагируют на вакцинацию, особенно с иммунодефицитным состоянием.

Для повышения эффективности антирабической иммунизации свой выбор мы остановили на ксимедонгидрохлориде - стимуляторе регенерации тканей.

Цель настоящей работы состояла в оценке иммунного ответа иммунодепрессивных кроликов, иммунизированных антирабической вакциной в сочетании с ксимедонгидрохлоридом.

В экспериментальной иммунизации кроликов породы «Шиншилла» антирабической вакциной из штамма «Щелково-51» на фоне иммунодепрессии изучено влияние ксимедонгидрохлорида на показатели иммунного ответа. Гуморальный иммунный ответ оценивали методом непрямого иммуноферментного анализа и в реакции нейтрализации, клеточный - по уровню лимфоцитов и белковому профилю.

Ключевые слова: бешенство; вакцинация; ксимедонгидрохлорид; иммунодепрессия; иммуностимуляция; иммунный ответ.

Исследования показали, что у животных с иммунодепрессией (иммунитет подавляли однократным введением циклофосфана-ЛЭНС, 50 мг/животное), вакцинированных двукратно с интервалом 10 дней в сочетании с ксимедонгидрохлоридом (5 мг/1 кг животного), через 1 месяц, наблюдается более высокий уровень специфических антител - 1:12800 (группа 1), по сравнению с контрольной 2 группой - 1:6400. В иммунокомпетентной группе 3 с однократной иммунизацией уровни антител были идентичны показателям 1 группы. Специфичность и защитный уровень антител оценивали в реакции нейтрализации при использовании рабочей дозы вируса бешенства 50LD50 (10-1,95) штамм «Овечий» ВГНКИ. Высокую степень защиты (50% выживших мышей) при максимальном разведении сывороток 1:800 показала группа с ксимедонгидрохлоридом. В группе 2 получено 75% выживших мышей в разведении сыворотки 1:400, что несколько ниже, чем при стимуляции, но эффективнее, чем при однократной вакцинации (1:400/50%). Референс-сыворотка защищала на 50% зараженных мышей при разведении 1:1600, что соответствует 20 МЕ/мл.

Через 6 месяцев иммунизации кролики всех групп были серонегативны и не имели защитного уровня антител. Также выявлено увеличение числа Т-клеток с супрессорной активностью, обуславливающих иммунологическую толерантность, в результате которой продуктивная активность антигенспецифического клона лимфоцитов значительно снизилась.

Положительная динамика по общему белку через 1 месяц иммунизации происходила за счет увеличения альбуминов и β -глобулинов (группа 1), β -глобулинов (группа 2), альбуминов и β -, γ -глобулинов (группа 3). Через 6 месяцев количество общего белка в группах 1 и 3 приблизилось к фоновым значениям, а в группе 2 показания общего белка были ниже первоначальных значений, но оставались в пределах физиологической нормы.

Сравнительный анализ полученных экспериментальных данных показал, что двукратная антирабическая иммунизация в сочетании с ксимедонгидрохлоридом способствует стимуляции всех звеньев иммунной

системы и характеризуется большей специфичностью противовирусного иммунитета [2].

Литература

1. Атрохова С.В. (2016). Анализ эпизоотической ситуации по бешенству в Нижегородской области. // Ветеринарный врач, №3, С.21-24.

2. Лосич М.А. (2011). Иммунобиологические свойства новой вакцины рабикс / М.А. Лосич, И.В. Непоклонова, О.А. Верховский и др. // Ветеринария, №12, С. 17-20.

PATHOLOGICAL CHANGES IN MINK CAUSED BY *H. PYLORI* INFECTION

Shamaev N.D.¹, Nurgaliev F.M.¹, Raginov I.S.²

¹–Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan, Russia

²–Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Helicobacter pylori infection is not diagnosed in fur farms. In most cases Helicobacteriosis remains unidentified, and sick animals and cases are registered under the diagnosis of other diseases. Methods of the prevention and treatment of *H. mustelae* in mink have not been developed. The solution of these problems is relevant for fur farming and will help to reduce mortality significantly among young minks, and, therefore, reduce economic losses

Study of pathological changes in the internal organs in mink with clinical signs of gastrointestinal tract lesions caused by *Helicobacter*.

Material-method: The biological material has been selected from the 30 mink (*Mustela lutreola*) with clinical signs of gastroduodenal pathology. We established *Helicobacter pylori* infection using laboratory studies and excluded infectious diseases with a similar etiology (distemper, pasteurellosis, viral enteritis minks, salmonellosis, Aleutian Disease) and toxicosis.

We selected biomaterial from the stomach, duodenum, liver for histological examination. Biomaterial fixation was performed using a 10% formalin solution, histological sections were prepared according to conventional techniques. Morphological studies of histological sections performed in the light microscope, eyepiece x10, lens x10, x40, and x100, using an immersion system.

Results: We found increased proliferation of skin cells and excessive accumulation of mucus in the apical part of gastric mucosa. Connective basis mucosa was infiltrated by lymphocytes. Sometimes erosive processes and contamination of mucosa by *Helicobacter mustelae* was registered.

The duodenal mucosa showed polymorphism of the villi, with signs of desquamative catarrh. We noted expressed edema in the submucosa, signs of mucoid swelling of the walls of blood vessels, areas of decay, necrosis, epithelial cells with areas of vacuolization, lack of cell borders, perivascular edema.

We found vast areas of fat and protein dystrophy in the liver, against the backdrop of a sharp plethora. In some cases necrobiosis of hepatocytes was included. The structure of lumens vessels and bile ducts in the triads was preserved, against the epithelial and endothelial cells atrophy with signs of necrobiosis.

Biomaterial from pancreas showed discomplexation of the final sections of the acini, the vacuolization of the cytoplasm, the proliferation of connective tissue between the acini.

We found researched bacterium in 85% of samples during bacteriological research method using fingerprints smear microscopy. We detected bacteria *H. mustelae* with biochemical methods in 75% of samples. Also we isolated strains on special growth medium in 27% of cases. Histological studies confirmed the diagnosis of *H. mustelae* infection in 37% of cases.

Conclusion: The degree of contamination of the mucous membrane by *H. mustelae* is closely related with the degree of activity of gastritis and ulcers. Analysis of the obtained data shows a significantly higher prevalence of *H. mustelae* infection in fur farming. However, further studies of minks are required to assess the factors leading to adverse outcomes, the importance of eradication therapy, and to develop an integrated approach to reduce the risks of adverse outcomes in sick animals.

ПАТОЛОГОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У НОРОК, СВЯЗАННЫЕ С ИНФЕКЦИЕЙ *HELICOBACTER PYLORI*

Шамаев Н.Д.¹, Нургалиев Ф.М.¹, Рагинов И.С.²

¹ – ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, Казань, Россия

² – ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Россия

На настоящий момент диагностика хеликобактериоза в звероводческих хозяйствах не проводится. В большинстве случаев хеликобактериоз остается неустановленным, а больные звери и падеж регистрируются под диагнозом других заболеваний. Не разработаны также методы профилактики и лечения хеликобактериоза норок. Решение этих проблем актуально для звероводства и поможет в значительной степени снизить смертность среди молодняка норок, а, следовательно, существенно уменьшить экономический ущерб.

Цель исследования – изучение патологоморфологических изменений во внутренних органах у норок с клиническими признаками поражения желудочно-кишечного тракта вызванными *H.pylori*.

Материалы и методы. Для исследования был отобран биоматериал от 30 норок (*Mustela lutreola*) с клиническими признаками гастродуоденальной патологии. Лабораторными методами исследований у них был установлен хеликобактериоз, и исключены инфекционные заболевания с схожей этиологией (чума плотоядных, пастереллез, вирусный энтерит норок, сальмонеллез, алеутская болезнь норок) и токсикозы.

Для гистологического исследования отбирали биоматериал из желудка, двенадцатиперстной кишки, печени и поджелудочной железы. Биоматериал фиксировали 10 % раствором формалина, изготавливали гистосрезы по общепринятым методикам. Морфологические исследования гистологических срезов проводили на световом микроскопе, окуляр x10, объектив x10, x40 и x100, последний с использованием иммерсионной системы.

Результаты исследований. В эпителии желез апикальной части слизистой оболочки желудка наблюдали усиленную пролиферацию клеток эпителия и обильное скопление слизи. Соединительнотканная основа слизистой оболочки обильно инфильтрирована лимфоцитами, местами эрозивные процессы. Регистрировали обсемененность слизистой оболочки бактериями *Helicobacter pylori*.

В слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки обнаруживали полиморфизм ворсинок, с признаками десквамативного катарального воспаления. В подслизистом слое отмечали выраженный отек, разволокнение и признаки мукоидного набухания стенки кровеносных сосудов, участки распада, некроза, клетки эндотелия с участками вакуолизации, отсутствие клеточных границы, периваскулярный отек.

В печени на фоне резкого полнокровия наблюдали обширные участки жировой и белковой дистрофии, а в отдельных случаях некробиоз гепатоцитов. Структура печени в портальной зоне характеризовалась сохранением профилей просвета сосудов и желчных протоков, но эндотелий и эпителиальные клетки с признаками атрофии и некробиоза.

В поджелудочной железе отмечали дисконкомплексацию конечных отделов ацинусов, вакуолизацию цитоплазмы, разрастание соединительной ткани между ацинусами.

В биоматериале от норок микроскопией мазков отпечатков *H.pylori* обнаружили в 85 % проб, в ускоренном уреазном тесте биоматериала – в 75 % пробах. Культуру *H.pylori* выделить на специальных питательных средах смогли в 27 % случаев. В ходе гистологических исследований диагноз на хеликобактериоз был подтвержден в 37 % случаев.

При патологоанатомическом исследовании у павших норок отмечали явления гастрита и язвы диаметром 3-10 мм в пилорической части желудка, его поверхность слизистой выглядела покрытой извилинами, иногда ткань была лизирована.

Заключение. Степень обсемененности слизистой оболочки желудка *H.pylori* находится в тесной связи со степенью активности гастритов и язв. Анализ полученных нами данных показывает значимо более высокую распространенность инфицирования *H.pylori* в пушном звероводстве. Однако требуется дальнейшие исследования норок для оценки факторов, приводящих к неблагоприятным исходам, значимости эрадикационной терапии, а также для разработки комплексного подхода для снижения рисков неблагоприятных исходов у больных животных.

INTEFERRING WITH HANTAVIRUS INTRACELLULAR TRANSPORT RESULTS IN DECREASED CYTOKINE PRODUCTION

Muyangwa M., Garanina E.E., Martynova E.V.,
Rizvanov A.A., Khaiboullina S.F.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Hantaviruses are negative sense, single stranded RNA viruses that belong to the *Bunyaviridae* family[1]. Depending on virus strain, hantaviruses represent as causative agents of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), hantaviral cardiopulmonary syndrome (HCPS) and nephropathia epidemica (NE). High mortality rate of HCPS and HFRS is determined by increased cytokine expression, a highlight of hantaviral infection [2]. Understanding of molecular mechanisms of regulation of cytokine production and intracellular transport of hantaviral proteins is quite actual.

Hantaviruses, just like many other viruses, utilize intracellular mechanisms for propagation [3]. Endosomes are membrane delimited intracellular transport carriers. Endosome status depends on protein marker and function, so that endosomes are classified as early (Rab5), late (Rab7, Rab9) or recycling endosomes (Rab 11) [4-5].

Following investigation is directed to study the effects of inhibiting endosomal transport on cytokine accumulation during hantaviral infection *in vitro*. For this purpose, recombinant lentivirus (LV) encoding the S-segment of Hantaan virus (HTV) was generated by co-transfection of HEK293-FT cells with the following plasmids: pLX-HTV-S; psPAX2 (packaging plasmid) and pCMV-VSV-G (envelope plasmid). N-protein expression was confirmed by western blot using polyclonal rabbit anti-ANDV antibody (exerting cross reactivity with Hantaan virus) and goat anti-rabbit IgG-HRP antibodies (Sigma).

To assess the role of early endosomes in trafficking of nucleocapsid protein and cytokine storm we primarily transfected A549 cells with DsRed plasmids encoding wild type (DsRed-Rab5-WT) or dominant negative form (DsRed-Rab5-DN) of Rab5 protein. A459 cells were infected with LV-HTV-S 48 hours post-transfection. Rab5 expression was confirmed by fluorescent microscopy. microscopy.

After 48 hours PI supernatants were collected and analyzed using xMAP Luminex Technology using panel of 27 cytokines (BioRad). Western blot analysis was performed to assess N-protein accumulation in cell lysates. It has been shown that N-protein production was twice less in cells transfected with DsRed-Rab5-DN plasmid in comparison with cells modified with DsRed-Rab5-WT. Obtained results have revealed that stable and accurate functioning of early endosomes is essential for synthesis of hantaviral nucleocapsid protein.

Multiplex analysis demonstrated decreased cytokine production in infected cells, transfected with DsRed-Rab5-DN plasmid. This fact confirms the necessity of proper functioning of early endosomes in hantaviral infection. Inhibition of Rab5 activity is likely to be a promising approach in prevention of HFRS.

References

1. Elliott, R.M. Molecular biology of the Bunyaviridae. J Gen Virol, 1990. 71 (Pt 3): p. 501-22.
2. Mir, M.A. Hantaviruses. Clin Lab Med, 2010. 30(1): p. 67-91.
3. Townsley, A.C. et al. Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. J Virol, 2006. 80(18): p. 8899-908.
4. Mellman, I. Endocytosis and molecular sorting. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. 12: p. 575-625.
5. Gorvel, J.P. et al. Rab5 controls early endosome fusion in vitro. Cell, 1991. 64(5): p. 915-25.

ИНГИБИРОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА ХАНТАВИРУСОВ ПРИВОДИТ К СНИЖЕНИЮ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ

Муянганва М., Гаранина Е.Е., Мартынова Е.В.,
Ризванов А.А., Хайбуллина С.Ф.

ФГАОУ ВО КФУ, Казань, Россия

Хантавирусы—это одноцепочечные РНК (-) вирусы, принадлежащие к семейству *Bunyaviridae* [1]. В зависимости от штамма, хантавирусы вызывают такие патологии, как геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), хантавирусный кардиолегочный синдром (ХКЛС) и эпидемическую нефропатию (ЭН). Высокая смертность при ГЛПС и ХКЛС обусловлена усиленной продукцией цитокинов, которая является основным маркером хантавирусной инфекции [2]. Таким образом, понимание молекулярных механизмов регуляции синтеза цитокинов, а также внутриклеточного транспорта белков хантавирусов представляется актуальным.

Как и многие вирусы, хантавирусы используют внутриклеточные механизмы для репликации [3]. В число таких механизмов входит использование внутриклеточных органелл, например, эндосом. В зависимости от маркерных белков и выполняемых функций эндосомы подразделяются на ранние (Rab5), поздние (Rab7, Rab9) или рециркулирующие эндосомы [4-5].

Данное исследование направлено на изучение влияния ингибирования эндосомального транспорта на синтез цитокинов при хантавирусной инфекции *in vitro*. Для достижения поставленной цели был сконструирован рекомбинантный лентивирус (LV), кодирующий S-сегмент вируса Хантаан (HTV), с помощью ко-трансфекции культуры клеток HEK293FT следующими плазмидами: pLX-HTV-S; psPAX2 (упаковочная плазмида) and pCMV-VSV-G (оболочечная плазмида). Биосинтез нуклеокапсидного белка был подтвержден методом вестерн блота с использованием поликлональных антител кролика к нуклеокапсидному белку вируса Андес (имеет кросс-реактивность к белкам вируса Хантаан) и антител ослика к IgG кролика (Sigma).

Для оценки роли эндосом в транспорте нуклеокапсидного белка и продукции цитокинов мы первоначально трансфицировали культуру клеток A549 плазмидной ДНК, кодирующей доминантно-негативную форму белка Rab5 (DsRed-Rab5-DN) или нормальную форму (DsRed-Rab5-WT). Через 48 часов инфицировали лентивирусом LV-HTV-S. Биосинтез белка Rab5 подтверждали флуоресцентной микроскопией.

Через 48 часов после инфекции были собраны клеточные супернатанты с последующим анализом по технологии xMAP Luminex с использованием панели, включающей 27 цитокинов (BioRad). Аккумуляцию нуклеокапсидного белка в клеточных лизатах оценивали методом вестерн блота. Было показано, что уровень синтеза нуклеокапсидного белка в два раза меньше в культуре клеток, трансфицированных плазмидой DsRed-Rab5-DN, по сравнению с клетками A549, трансфицированных плазмидой DsRed-Rab5-WT. Полученные результаты подтверждают тот факт, что стабильная и полноценная экспрессия белков ранних эндосом необходима для биосинтеза нуклеокапсидного белка.

Методом мультиплексного анализа нами было также показано снижение продукции цитокинов в супернатантах клеток, трансфицированных плазмидой DsRed-Rab5-DN. Данный факт служит подтверждением необходимости корректного функционирования ранних эндосом при хантавирусной инфекции. Таким образом, ингибирование функции белка Rab5 может быть перспективно при терапии ГЛПС.

Литература

1. Elliott, R.M. *Molecular biology of the Bunyaviridae*. J Gen Virol, 1990. 71 (Pt 3): p. 501-22.
2. Mir, M.A. *Hantaviruses*. Clin Lab Med, 2010. 30(1): p. 67-91.
3. Townsley, A.C. et al. *Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway*. J Virol, 2006. 80(18): p. 8899-908.
4. Mellman, I. *Endocytosis and molecular sorting*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. 12: p. 575-625.
5. Gorvel, J.P. et al. *rab5 controls early endosome fusion in vitro*. Cell, 1991. 64(5): p. 915-25.

BIOMEDICAL ENTREPRENEURSHIP

Wren A.

The Wren Group

Entrepreneurs have always been with us: from the person who worked out a better way of attaching the axe head to the Neolithic shaft for barter, to the medieval inventions of the clock and printing press, to the highly profitable 21st century tech giants of our global economy. They are the individuals who identify and evaluate an opportunity, pocketing any eventual profits but also assuming all the risks- which are many.

During the last 120 years, biomedical entrepreneurship has progressed from dubious electrical machines, cigarettes that "clear a stuffy head" and tonics that "are good for you" to multimillion dollar enterprises researching, testing and marketing amazing pharmaceuticals and medical devices that markedly improve human and animal health.

Spurious claims and unfortunately deaths, as well as an acceleration of our understanding of the body led, in the 1970s, to many governments demanding that new biomedical products be tested for safety and efficacy before launching on the unsuspecting public. This immediately and dramatically increased the costs of development which is still reflected today as almost all biomedical startups spring from the academic departments where the research is taking place. An effective Technology Transfer department is an essential part of any research University.

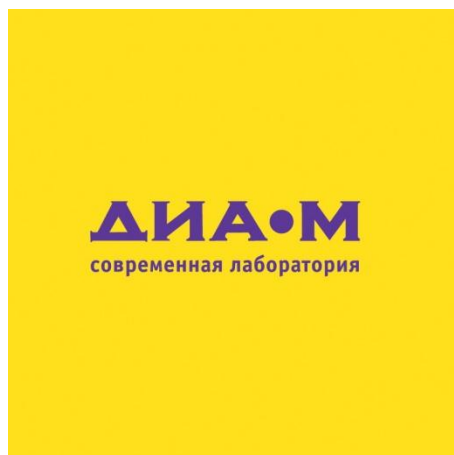
This review will focus on how biomedical startups can be funded (Venture Capital, Banks, Governments, financial "angels" and even 21st century crowdfunding), the importance of owning your intellectual property (patents, copyright, trademarks, trade secrets) and the crucial role of state and local regulations in the creation of a fiscal and social environment friendly to private innovation. Failure will figure in the discussion as some countries and societies stigmatise this and yet it is failure that teaches the entrepreneur how to succeed next time!

I started a new wound healing company in the U.K. in 1985 and was the technical and regulatory consultant to two others - injectable hyaluronic acid and collagen implants from pig skin. These successes were followed by a failure to set up a US company with very promising technology to help very premature babies learn how to suck-swallow-breathe. I will use these examples to discuss why low- and high-tech startups fail and the importance of the right team. The five phases of a successful biomedical startup will be described:

1. identification and evaluation of the opportunity,
2. development of the business plan,
3. determination of the required resources,
4. management of the resulting enterprise,
5. development and execution of the exit strategy.

Finally and again using my own experience of setting up a successful Standup Paddleboard company in the USA in 2009, I will emphasise the problems facing all startups and how to overcome them.

Спонсоры конференции:



ООО «ХеленаРУС»

MERCK

ЭПР технологии



Bristol-Myers Squibb

**клеточный анализатор
MUSE[®] - 990 тысяч рублей**
ФИКСИРОВАННАЯ СТОИМОСТЬ НА 2017 ГОД!

26 регулярно обновляемых модулей на
нашем сайте MERCKmillipore.com



**Простой и быстрый анализ
с реагентами Muse[®]:**

- Подсчет клеток и оценка их жизнеспособности
- Пролиферация клеток
- Апоптоз
- Клеточные сигнальные пути
- Клеточный цикл
- Повреждения ДНК
- Аутофагия
- Иммунология

Наши контакты:

ООО "Мерк"
115054, г. Москва, ул. Валуева, д. 35
Моб. тел.: +7(910) 142-61-77
Прохорова Марина - специалист
E-mail: mm.russia@merckgroup.com
MERCKmillipore.com/muse

MERCK

Демонстрация возможностей клеточного анализатора Muse
Обзор современных молекулярных и клеточных технологий

Дата: 31 мая (17:00-18:00) - 1 июня (10:00-18:00)

Адрес: Бутлерова, 26, 4 этаж, ауд. №407, Кафедра клинической лабораторной диагностики

Контакты: Прохорова Марина Владимировна, к.б.н., специалист по оборудованию Merck, Россия

marina.prokhorova@merckgroup.com, +7 (910) 142-61-77

Мастер-класс «Демонстрация возможностей клеточного анализатора Muse:

- Набор **Count&Viability kit** на образцах, предоставленных участниками мастер-класса (любые клетки)
- Набор **Annexin V&Dead Cell Kit** на образцах, предоставленных участниками мастер-класса (любые клетки в разных стадиях апоптоза)

www.merckmillipore.com



ООО «Био-Рад Лаборатории»
105064, Москва, Нижний Сусальный пер.,
дом 5, стр. 5А,
Тел: (495) 721-14-04
Факс: (495) 721-14-12
info_russia@bio-rad.com
www.bio-rad.com

Компания **Bio-Rad Laboratories, Inc USA** (Био-Рад, США) является одним из мировых лидеров производства оборудования и реагентов для научных исследований. В рамках взаимодействия с научными, медицинскими, биотехнологическими и образовательными организациями Био-Рад предлагает современные технологии, оборудование и реагенты.

Геномные технологии (*геновая экспрессия и геновая модуляция*)

- Амплификация
- Цифровая капельная ПЦР третьего поколения
- Гель-электрофорез
- Системы визуализации
- Перенос генов



Протеомные технологии (*структурная и функциональная протеомика*)

- BioLogic LP (*модульная гибкая система для биохроматографии*)
- Широкий спектр колонок и носителей
- NGC (*автоматизированная хроматографическая система очистки рекомбинантных белков*)
- Оборудование для анализа и процессинга 2D протеомных карт
- Bio-Plex (*мультиплексный количественный анализ биомаркеров с использованием технологии xMap*)



Клеточные технологии

- S3 сортер клеток
- ZE5 Проточный цитофлуориметр
- ZOE флуоресцентный имиджер
 - Счетчик клеток TC20



**VI Международная научно-практическая конференция
«Новые концепции механизмов воспаления,
аутоиммунного ответа и развития опухоли»
Казань, Татарстан
31 мая – 2 июня 2017 г.**

**The VIth International Meeting
"New concepts on the mechanisms
of inflammation, autoimmunity and tumorigenesis"
Kazan, Tatarstan, Russia
May, 31 – June, 2, 2017**

*Материалы опубликованы в авторской редакции
Materials are published in author's edition.*

Поддержано грантом РФФИ 17-04-20106

Отпечатано в полном соответствии с качеством
предоставленного электронного оригинал-макета

Формат 60–84. Печать Ризография 11,25 усл.п.л.
Тираж 300 экз. Заказ № 60
Подписано к печати: 24.05.2017

Участок ротапринтной печати НБ КГМА
(420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 36)

ISBN 978-5-9906679-4-5

