СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY

ГОД ОБРАЗОВАНИЯ В СОДРУЖЕСТВЕ НЕЗАВИСИМЫХ ГОСУДАРСТВ

ПРОСПЕКТ СВОБОДНЫЙ-2016

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ СТУДЕНТОВ,
АСПИРАНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ

ЭЛЕКТРОННЫЙ СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ СТУДЕНТОВ, АСПИРАНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ **«ПРОСПЕКТ СВОБОДНЫЙ-2016»**, ПОСВЯЩЁННОЙ ГОДУ ОБРАЗОВАНИЯ В СОДРУЖЕСТВЕ НЕЗАВИСИМЫХ ГОСУДАРСТВ

КРАСНОЯРСК, СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
15-25 АПРЕЛЯ 2016 Г.

Министерство образования и науки Российской федерации
ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет»

Сборник материалов Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Проспект Свободный-2016», посвящённой Году образования в Содружестве Независимых Государств

Красноярск, Сибирский федеральный университет, 15-25 апреля 2016 г.

Красноярск, 2016

«Медицинская биология»

УДК 615.038

КОРРЕКЦИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРЕПАРАТАМИ НА ОСНОВЕ АЛОЭ И АКТОВЕГИНА В НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ

Бартицкая О.И., Лукшина М.А., Шестак Д.О., Глушкова Т.В.
научные руководители канд. биол. наук Титова Н.М.,
канд. мед. наук Веселова О.Ф.
Сибирский федеральный университет

С каждым годом повышается количество воспалительных заболеваний полости рта во всем мире, а также наблюдается низкая эффективность лечебно-профилактических мероприятий. В связи с этим, проблема лечения воспалительных заболеваний пародонта является одной из актуальных и значимых в медицине [1].

Известно, что воспалительные процессы, независимо от характера инициирующих этиологических факторов, всегда сопровождаются развитием оксидативного повреждения тканей, вызванного гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК) [2, 3].

Избыток АФК инициирует процессы окислительной модификации белков (ОМБ) и перекисного окисления липидов (ПОЛ). Окислительные реакции в очаге воспаления сопровождаются накоплением функционально неактивных белковых молекул и высокотоксичных перекисных продуктов, способствующих дальнейшей деструкции клеток, сосудов и элементов соединительной ткани. Стационарный уровень АФК в клетках поддерживается многоуровневой антиоксидантной системой (АОС), включающей антиоксидантные ферменты и неферментативные низкомолекулярные антиоксиданты [4].

Цель исследования – изучить влияние новых лекарственных форм на основе алоэ и актовегина на свободнорадикальное окисление липидов и белков, состояние антиоксидантной системы при воспалительных процессах полости рта у крыс в модельном эксперименте.

Материалы и методы

Исследования проведены на белых крысах линии Вистар обоего пола. Животные были поделены на 5 групп: 1 группа – интактные (контроль); 2 группа – модель воспаления; 3 группа – воспаление и лечение дентальным гелем, содержащим алоэ; 4 группа – воспаление и лечение дентальным гелем, содержащим актовегин; 5 группа - воспаление и лечение дентальным гелем, содержащим комплекс актовегина и алоэ.

Модель воспаления получали путем нанесения на десну животного 5%-ного раствора едкого натра в виде аппликации на 10 секунд [5]. Через 1 час развивался воспалительный процесс, выражающийся в резком отеке слизистой оболочки языка. После этого применяли испытуемое лечебное средство для полости рта по схеме и в дозировке, рекомендуемой к клиническому применению. Эксперимент длился в течение 10 дней, по окончании которого проводили декапитацию животных. Забор крови осуществляли с гепарином в качестве антикоагулянта. Объектом исследования служили отмытые от плазмы и упакованные эритроциты.

Для оценки эффективности лечения в эритроцитах контрольной и опытных групп крыс определяли продукты окислительной модификации биомолекул – карбонильные производные белков (КПБ) и малоновый диальдегид (МДА) – маркер перекисного окисления липидов. Об активности антиоксидантной системы судили по содержанию восстановленного глутатиона (GSH), активности важнейших антиоксидантных ферментов: супероксидисмутазы (SOD), каталазы (CAT),

глутатионпероксидазы (GPx), глутатионтрансферазы (GST). Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0.

Результаты исследования и их обсуждение

У животных с воспалением полости рта отмечалось увеличение в эритроцитах окисленных продуктов, как белков, так и липидов. Содержание карбонильных производных белков было увеличено в 2 раза, МДА – в 1,5 раза по сравнению с аналогичными показателями в красных клетках крови контрольной группы крыс, что свидетельствует о развитии окислительного стресса при воспалении (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние новых лекарственных форм на основе алоэ и актовегина на содержание продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов, активность супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах контрольной и опытных групп крыс

Группа экспериментальных животных	**КПБ нмоль/мг Hb**	**МДА мкмоль/г Hb**	**CAT мкмоль/мин/ г Hb**	**SOD усл. ед/мин/ г Hb**
Контроль	36,3 ± 3,3	5,2 ±1,6	357 ± 24	1228 ± 122
Аппликация 5%-ным NaOH	72,6±10,4*	8,9 ± 3,2	238 ± 48	1440 ± 64
Аппликация NaOH + алоэ	24,0 ± 1,2*	6,6 ± 1,4	252 ± 93	1024 ± 164
Аппликация NaOH +актовегин	14,7 ± 2,0*	3,5 ± 1,5	243 ± 36*	1187 ± 264
Аппликация NaOH +алоэ и актовегин	39,2 ± 5,0	4,7 ± 0,5	235 ± 31*	1340 ± 82

*- данные достоверны относительно контроля

Использование для лечения дентального геля, содержащего алоэ, а также геля с актовегином, приводит к достоверному снижению в эритроцитах содержания КПБ на 34% и 59% соответственно по сравнению с контролем. В том случае, когда для лечения использовался дентальный гель с комплексом алоэ и актовегина уровень карбонильных групп в белках не отличался от контрольного показателя. Содержание МДА при всех вариантах лечения достоверно не отличалось от контроля.

Таблица 2 – Влияние новых лекарственных форм на основе алоэ и актовегина на содержание восстановленного глутатиона и активность глутатионзависимых ферментов в эритроцитах контрольной и опытных групп крыс

Группа экспериментальных животных	**GSH мкмоль/г Hb**	**GPO мкмоль/г Hb**	**GST ммоль/мин*г Hb**
Контроль	1,3 ± 0.04	15,3 ± 6.2	9,0 ± 0.2
Аппликация 5%-ным NaOH	0,9 ± 0.06*	9,1 ± 0.2*	3,1 ± 0.3*
Аппликация NaOH + алоэ	1,1 ± 0,3	12,6 ± 8.1	6,4 ± 4.7
Аппликация NaOH + актовегин	1,0 ± 0.1	8,6 ± 4.9*	3,9 ± 3.5*
Аппликация NaOH + алоэ и актовегин	1,2 ± 0.4	13,2 ± 2.3	4,9 ± 0.7*

*- данные достоверны относительно контроля

Активность SOD в эритроцитах при воспалительном процессе имела тенденцию к повышению, а каталазы – к снижению активности. Активность каталазы оставалась достоверно сниженной при лечении воспалительного процесса дентальным гелем с актовегином и комплексом алоэ плюс актовегин.

Глутатионовое звено антиоксидантной системы вносит существенный вклад в устранение, как активных форм кислорода, так и продуктов перекисного окисления липидов. GSH способен не только напрямую взаимодействовать с АФК, он также является косубстратом реакций, катализируемых GPO и GST, в ходе которых происходит нивелирование продуктов липопероксидации, в том числе и МДА.

В таблице 2 приведены данные, свидетельствующие, что в группе животных с воспалением полости рта, достоверно снижается уровень основного небелкового антиоксиданта – GSH, а также активность GPO и GST по сравнению с аналогичными показателями в эритроцитах контрольной группы крыс. Так, содержание GSH в эритроцитах при воспалительном процессе ниже контрольной величины на 30%, активность GPO и GST – на 40% и 65% соответственно ($p < 0,05$).

При лечении воспаления разными лекарственными формами не найдено достоверных отличий в содержании восстановленного глутатиона и активности гллутатионпероксидазы (за исключением применения дентального геля с актовегином).

Активность глутатион-S-трансферазы остается достоверно сниженной, как в случае применения геля с актовегинома, так и комплекса алоэ с актовегином, и достаточно выраженной – на 56 и 45% по сравнению с активностью GST в эритроцитах контрольной группы животных.

Анализ полученных результатов позволяет сделать следующие выводы:

1. При смоделированном воспалительном процессе в ротовой полости у крыс интенсифицируется свободнорадикальное окисление белков и липидов, о чем свидетельствует увеличение внутриклеточного уровня карбонильных производных белков и малонового диальдегида.

2. Развитию окислительного стресса способствует снижение эффективности работы глутатионового звена антиоксидантной системы и каталазы.

3. Использование новых лекарственных форм на основе алоэ и актовегина устраняет воспалительный процесс в ротовой полости крыс.

4. Карбонильные производные белков служат надежным маркером оксидативного стресса, развивающегося при воспалительном процессе в ротовой полости у крыс, и показателем, адекватно отражающим его коррекцию лекарственными препаратами с антиоксидантными свойствами.

Список литературы

1. Данилевский Н. Ф. Заболевания пародонта / Н. Ф. Данилевский, А. В. Борисенко. – К.: Здоров’я, 2000. – 160 с.

2. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин [и др.]. – Новосибирск, АРТА, 2008. - 284 с.

3. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости: метод. рекомендации // А. П. Левицкий, О. В. Деньга, О. А. Макаренко [и др.] – Одесса: КП ОГТ, 2010 – 16 с.

4. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты \ Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков [и др.]. – М.: Фирма «Слова», 2006. - 556с.

5. Левицкий А.П. Экспериментальные методы воспроизведения гингивита / А.П. Левицкий // Инновации в стоматологии.-2013.- №1.-С. 2 – 6.

УДК 57.085.23

КЛЕТОЧНЫЕ МАТРИКСЫ ИЗ ПОЛИТЕТРАФТОРЭТИЛЕНА ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Винокурова Д. А.
научный руководитель д-р биол. наук Шишацкая Е. И.
Сибирский федеральный университет

Тканевая инженерия является перспективным подходом к восстановлению повреждённых и утраченных органов и тканей. Он заключается в создании тканевых эквивалентов на основе живых клеток и матриксов – искусственно полученных каркасов, имитирующих внеклеточный соединительно-тканный матрикс тканей. Политетрафторэтилен – синтетический материал, широко использующий для создания медицинских имплантов благодаря сочетанию своих свойств: высокая механическая прочность, устойчивость к коррозии и биосовместимость [1]. Кроме того он проявляет высокую устойчивость к бактериальной инфекции. Однако высокая степень гидрофобности поверхности ограничивает сферы применения материала до случаев, когда не требуется адгезия и прорастание клетками [2].

Перспективным материалом для создания матриксов являются полигидроксиалканоаты – один из видов биополимеров, получаемых путем микробиологического биосинтеза на различных субстратах [3]. Они полностью удовлетворяют требованиям биосовместимости и биорезорбируемости, предъявляемым к материалам для создания клеточных матриксов. Один из наиболее исследованных представителей семейства - поли-3-гидроксибутират (П3ГБ) - был исследован в качестве покрытия биоинертного полимерного материала.

Пластины из пористого политетрафторэтилена размером 5*5 см толщиной 1 мм ("Экофлон", Санкт-Петербург) имеют узелково-фибриллярную структуру, пористость до 90 %, гибкость и прочность в направлении ориентации. Были определены физико-механические характеристики материала:

предел прочности	38,12±3,546 MPa
нагрузка при разрыве	13,45 ± 2,263 N
удлинение при разрыве	38,39 ± 1,978 %.

Композитные матриксы получали путём покрытия материала Экофолон поли-3-гидроксибутиратом. Для этого пластину Экофлона нарезали на квадратные матриксы размером 1*1 см. Экспонировали матриксы в растворе П3ГБ в дихлорметане 0,5% w/v до полного замещения воздуха в порах раствором. Высушили матриксы в ламинаре. Полученные матриксы стерилизовали плазменной обработкой в Sterrad.

Исследование методом электронной микроскопии показало сглаженный характер поверхности на большей площади материала (рис.1). Полимерное покрытие не изменило топографию поверхности.

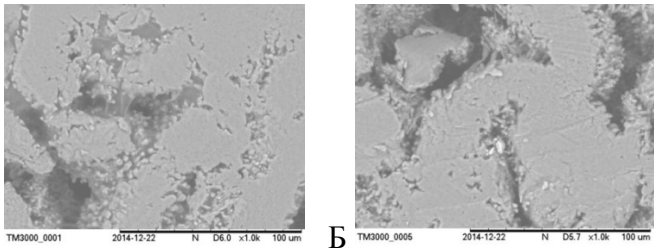

Рис.1 – Структура поверхности матриксов:
А – матрикс из Экофлона, Б – матрикс из Экофлона, покрытого П3ГБ

Однако полимерное покрытие повлияло на свойства поверхности по отношению к воде. Покрытие позволило увеличить свободную энергию поверхности (Таблица 1). Изменения в основном были вызваны возрастанием дисперсной составляющей, обусловленной силами Ван-дер-Ваальса и другими неспецифическими взаимодействиями. Это связано с тем, что на поверхности полимера практически отсутствуют полярные группы. Тем не менее, было зафиксировано также возрастание полярной составляющей, обусловленной сильными взаимодействиями и водородными связями. Это обеспечило композитные матриксы менее гидрофобной поверхностью, что изменило характер взаимодействия носителя с клетками.

Таблица 1 – поверхностные характеристики матриксов

Материал	Контактный угол смачивания	Свободная энергия поверхности	Полярная составляющая	Дисперсная составляющая
Экофлон	117±2,66	8,6±0,36	1±0,17	7,6±0,19
Экофлон, покрытый поли-3-гидроксибутиратом	110,3±1,29	12,3±0,7	1,5±0,14	10,8±0,57

Способность матриксов поддерживать адгезию и пролиферацию клеток оценивали в постоянной клеточной линии эмбриональных фибробластов мыши NIH 3T3. В качестве контроля приняли полистироловую поверхность культуральных планшетов. Клетки культивировали в CO2-инкубаторе в гумидной атмосфере 5% CO2 при 37ºC. Для приготовления питательной среды использовали многокомпонентную среду DMEM, эмбриональную телячью сыворотку (10%) и раствор антибиотиков (пенициллин, стрептомицин). Для снятия клеток с поверхности культуральных флаконов использовали трипсин, титр суспензии определяли с помощью камеры Горяева и высевали клетки из расчёта 2,5*103 клеток на матрикс.

Жизнеспособность культивируемых клеток оценивали в МТТ-тесте. Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид до формазана и говорит об активности митохондрий клеток. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 540 нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad LABORATORIES Inc, США). Результаты МТТ-теста показывают, что покрытие из поли-3-гидроксибутирата значительно повысило способность тефлоновых матриксов поддерживать пролиферацию клеток (график 1). Тем не менее, эта способность не сравнима с материалами, традиционно используемыми для культивирования клеток (полистирол).

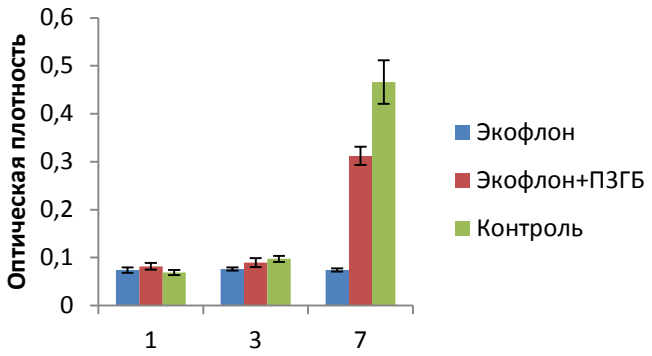

График 1 – Результаты МТТ-теста

Для оценки жизнеспособности клеток применялся набор LIVE/DEAD (4 мкМ этидиум гомодимер-1 (EthD-1), 2 мкМ кальцеин АМ) Окрашенные образцы исследовали методом флуоресцентной микроскопии. Количество клеток на поверхности матриксов с не модифицированной поверхностью крайне мало (рисунок 2). По окрашиванию гомодимером этидия можно сделать вывод о нежизнеспособности клеток. Поверхность композитных матриксов более равномерно покрыта клетками, нежизнеспособные клетки единичны.

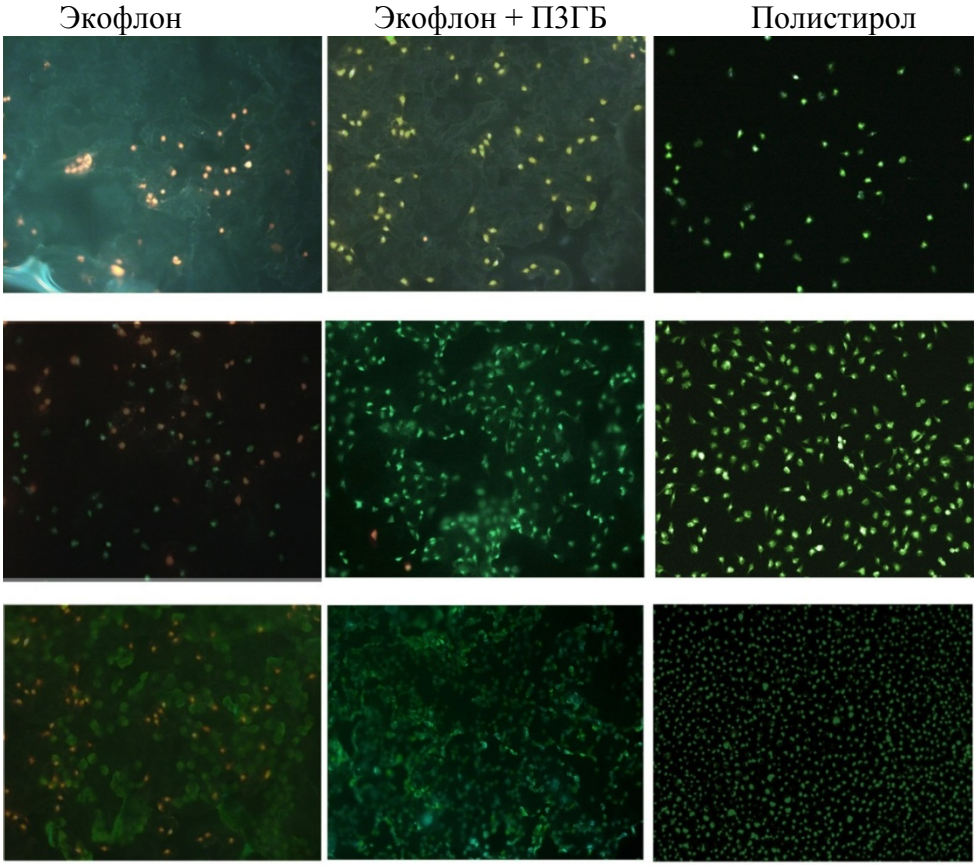

Рис.2 – Жизнеспособность клеток после 1, 3, 7 суток культивирования

Таким образом, покрытие из поли-3-гидроксибутирата позволило повысить способность матриксов поддерживать адгезию и пролиферацию клеток. Дальнейшая модификация носителя с целью повышения гидрофильности может быть достигнута созданием на поверхности полярных групп.

Список литературы

1. Designing a Three-dimensional Expanded Polytetrafluoroethylene–Poly(lactic-co-glycolic acid) Scaffold for Tissue Engineering / H.-J. Shao, C. S. Chen, I-C. Lee et al. // Artificial Organs. – 2009. – V. 33, I. 4. – P. 309–317.
2. Comparative analysis of adherence, viability, proliferation and morphology of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells seeded on different titanium-coated expanded polytetrafluoroethylene scaffolds / T. Hollweck, M. Marschmann, I. Hartmann et al. // Biomedical Materials. – 2010. – V. 5. 065004. DOI:10.1088/1748-6041/5/6/065004.
3. Williams, S. F. Applications of PHAs in medicine and pharmacy / S. F. Williams, D. P. Martin, A. Steinbchel, ed. // Series of Biopolymers in 10 vol. 2002.

УДК 57.041

ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОТНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ И ПЕРИТОНИТОМ И ДИФФУЗНО ТОКСИЧЕСКИМ ЗОБОМ

Самойлова А.А., Диденко В.М.
научный руководитель канд. биол. наук Гершкорон Ф.А.
Сибирский федеральный университет

Рак почки – это злокачественное опухолевое образование, которое развивается в одной или в обеих почках, преимущественным образом произрастает на основе эпителиального слоя (поверхностного слоя) поражаемого органа и склонно к метастазированию. Рак почки, симптомы которого чаще всего отмечаются у мужчин в возрасте 55-75 лет, также диагностируется у женщин, причем в период рассмотрения статистики последних лет наблюдается рост заболеваемости по жителям развитых стран. Рак почки в плане процессов, актуальных для него, заключается в появлении в почке бесконтрольно делящихся опухолевых злокачественных клеток, за счет чего на их основе образуется опухоль.[1]

Почки участвуют в эритропоэзе. Эритропоэз стимулируется уменьшением доставки кислорода к тканям, которое детектируется почками. Почки в ответ на тканевую гипоксию или ишемию выделяют гормон эритропоэтин, который стимулирует эритропоэз. Этот гормон стимулирует пролиферацию и дифференциацию клеток-предшественников красного кровяного ростка, приводя тем самым к ускоренному эритропоэзу в кроветворных тканях и к увеличению выхода эритроцитов в кровь.[6] Исследуя кислотную резистентность эритроцитов, можно судить о состоянии почек. Определение кислотной резистентности эритроцитов позволяет точно определить устойчивость к гемолизу и возрастной состав красных клеток крови.[2]

Перитонит – воспаление париетального и висцерального листков брюшины, которое сопровождается отравлением организма и сопутствующим нарушением работы многих органов и систем. Как правило, перитонит является осложнением заболеваний и травм брюшной полости. Этиологией перитонита обычно служит бактериальный возбудитель, например, кишечная палочка и патогенные кокки. Во время перитонита происходит общая интоксикация организма.

В тяжёлой стадии перитонита на фоне интоксикации возможно развитие острой почечной недостаточности, в почечных канальцах скапливается нерастворимый белок, в моче появляются зернистые цилиндры.[3]

Сегодня можно с убедительностью утверждать о том, что эритроциты вовлекаются в патологический процесс не только при гематологических заболеваниях, но и претерпевают серьезные изменения структуры и функции при болезнях разного генеза. Структурно-функциональные свойства эритроцитов входят в цепь приспособительных механизмов, поддерживающих постоянство внутренней среды, как в норме, так и в условиях патологии. Развивающийся «окислительный взрыв» приводит к повышению процессов перекисного окисления липидов, как внутри клетки, так и в ее мембране.

У больных с легкой формой перитонита при поступлении снижается количество β-спектрина и подфракции анкирина и повышается содержание белка полосы 4.1, 4.2, дематина и тропомиозина, повышается общая сорбционная способность эритроцитов и концентрация малонового диальдегида. [4]

У больных с тяжелой формой перитонита дополнительно снижается количество α-спектрина, анионтранспортного белка, белка полосы 4.5, глицеральдегид-3-

фосфатдегидрогеназы (Г3ФД) и повышается количество актина, кроме это снижается общая сорбционная способность эритроцитов и достоверно больше возрастает внутриклеточная концентрация малонового диальдегида.

Диффузный токсический зоб - аутоиммунное заболевание, обусловленное избыточной секрецией тиреоидных гормонов диффузной тканью щитовидной железы, приводящее к отравлению этими гормонами — тиреотоксикозу.

В настоящее время диффузный токсический зоб рассматривается как наследственное аутоиммунное заболевание, которое передаётся многофакторным путём. Факторы, провоцирующие развитие заболевания: психические травмы, инфекционно-воспалительные заболевания, черепно-мозговые травмы, заболевания носоглотки. Заболевание наиболее часто встречается у женщин, в 8 раз чаще, чем у мужчин. Чаще всего оно развивается в среднем возрасте (наиболее часто между 30 и 50 годами), но не является редкостью заболевание и у подростков и молодых людей, в период беременности, менопаузы и у людей старше 50 лет. [5]

В литературе, посвященной диффузному токсическому зобу, неоднократно подчеркивалась роль психической травмы, эмоционального стресса в развитии заболевания. И все же следует иметь в виду, что при стрессе повышается секреция гормонов мозгового вещества надпочечников, которые, как известно, увеличивают скорость синтеза и секреции тироидных гормонов. При диффузном токсическом зобе изменения в общем анализе крови долго отсутствуют, но затем появляется тенденция к увеличению числа эритроцитов.

Целью данной работы стало исследование кислотной резистентности эритроцитов у больных раком почки, перитонитом и диффузно токсическим зобом. В соответствии с целью, была поставлена задача исследовать кислотные эритрограммы больных данными заболеваниями.

Для распределения эритроцитов по стойкости к различным гемолитикам используется метод кислотных эритрограмм. Для измерения кинетики гемолиза используется установка, состоящая из фотоэлектрического колориметра и водяного термостата. Гемолитик - соляная кислота. Анализ проводится при температуре 24 градуса по Цельсию. Результатом опыта является ряд значений оптической плотности, убывающей во времени в соответствии с ходом гемолиза.[2]

Основным фактором, определяющим стойкость эритроцита, является его возраст. При этом наиболее молодые, выходящие из костного мозга, эритроциты обладают наибольшей стойкостью и занимают на эритрограмме крайнее правое положение. Циркулируя в русле, эритроциты созревают и в дальнейшем стареют. Эти процессы сопровождаются постепенным снижением стойкости, что на эритрограмме отражается смещением влево. При нормальном состоянии взрослого организма эритрограмма строго стабильна и отражает динамическое равновесие в системе крови.[2]

Объектом исследования служила цельная кровь, взятая утром натощак из локтевой вены. Было обследовано 8 образцов крови больных раком почки, 5 образцов крови больных перитонитом и 9 образцов крови больных диффузным токсическим зобом. В качестве контроля использовали 18 образцов цельной крови здоровых людей.

В ходе выполненной работы были получены и исследованы эритрограммы больных раком почки, перитонитом, диффузным токсическим зобом и здоровых людей. В результате были получены следующие данные:

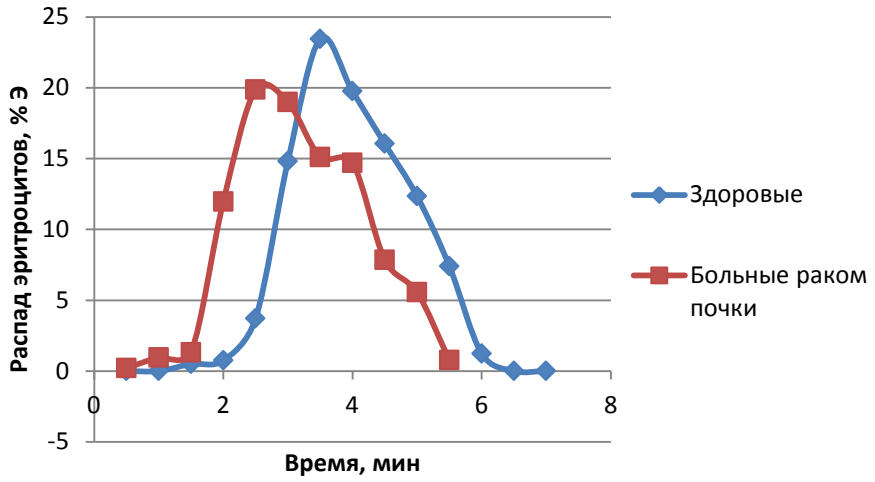

График 1 – Эритрограмма больных раком почки и здоровых

Для крови здорового пациента характерно начало гемолиза на 2 минуте, резкий максимум наблюдается на 3.5 минуте, сама длительность гемолиза составляет 6 минуты. С начала отсчета и до 2 минуты наблюдаются сферуляционные изменения эритроцитов.

Для крови больных раком почки характерно начало гемолиза на 1.5 минуте, резкий максимум наблюдается на 2.5 минуте, длительность гемолиза составляет 5.5 минут. Эритрограмма больных раком почки сдвинута влево, связанно это с преобладанием старых эритроцитов в системе крови. Объясняется это тем, что при патологии почки нарушается синтез эритропоэтина, стимулирующего образование новых эритроцитов.

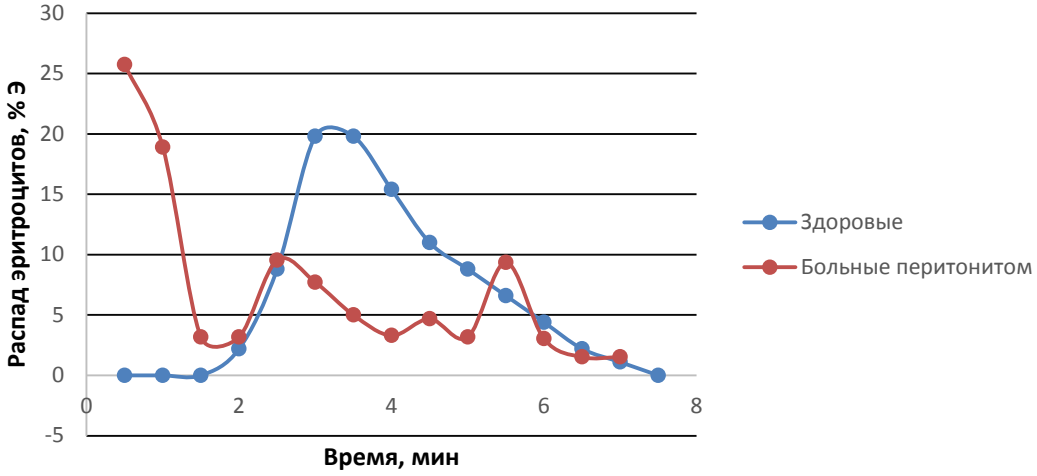

График 2 – Эритрограмма больных перитонитом и здоровых

Для крови больных перитонитом характерно начало гемолиза на 0.5 минуте. На это же время приходится максимальное количество гемолизованных эритроцитов, длительность гемолиза составляет 7 минут. Эритрограмма больных перитонитом сдвинута влево и имеет несколько небольших пиков. Смещение эритрограммы влево связано с увеличением процессов перекисного окисления мембранных липидов, уменьшением прочности и деформируемости эритроцитарной мембраны, повышении

общей сорбционной способности эритроцитов и их гликокаликса и снижении их метаболической активности, что в конечном итоге ускоряет процессы старения красных клеток крови. Наличие нескольких пиков объясняется тем, что токсическое действие продуктов метаболизма на мембраны молодых форм эритроцитов не приводит к критическому повреждению фосфолипидного бислоя мембран, однако способно формировать более жесткую мембрану, что приводит к резкому снижению трансмембранного транспорта эритроцита и увеличению прочности мембраны.

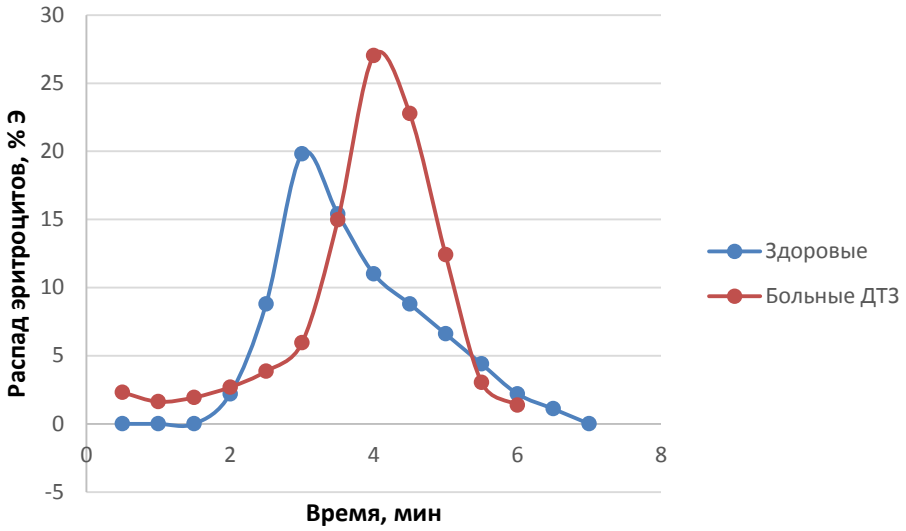

График 3 – Эритрограмма больных ДТЗ и здоровых

Для крови больных диффузным токсическим зобом характерно начало гемолиза на 3 минуте, резкий максимум наблюдается на 4.5 минуте, длительность гемолиза составляет 6 минут. Эритрограмма больных диффузным токсическим зобом сдвинута вправо, это связано с выходом в кровяное русло большего числа эритроцитов. Объясняется это тем, что при данной патологии появляется тенденция к увеличению числа эритроцитов в системе крови.

Список литературы

1.Давыдов М.И., Онкология: учебник / М. И. Давыдов, Ш. Х. Ганцев. - 2010. - 920 с.

2. Гительзон И.И., Эритрограммы как метод клинического исследования крови: учеб. Пособие / И.И. Гительзон, И.А. Терсков - Красноярск: Издательство Сибирского отделения Академии наук СССР, 1959. — 247 с.

3. Беловолова В.Н, Нарушения структурно-функциональных свойств эритроцитов у детей с аппендикулярным перитонитом: учебник / В.Н. Беловолова, С.А. Долгарева - Успехи современного естествознания. – 2013. – № 9. – С. 21-22;

4. Савельев В.С., Перитонит: практическое руководство / В.С. Савельев – Москва, Издательство «Литтерра» - 2006.

5. Фархутдинова Л.М., Диффузный токсический зоб: современные представления и анализ клинического случая: научная статья / Л.М.Фархутдинова, Д.У.Аллабердина, Г.А.Гайсарова - Медицинский вестник Башкортостана- № 5 -2011

6. Гайтон А.К. Медицинская физиология: учеб. / А.К. Гайтон - М.: Логосфера, 2008. - 1253 с.

УДК 577.2

ПРИМЕНЕНИЕ БИОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ГИПЕРТЕРМИИ

Дубынина А.В.
научный руководитель д-р биол. наук Замай Т.Н.
Сибирский федеральный университет

Уникальные свойства материалов, диспергированных до размеров наночастиц, находят применения в самых разнообразных областях – от космических технологий и солнечной энергетики до медицины. Оптические свойства таких материалов существенно отличаются от макрообразцов: наночастицы поглощают оптическое излучение в той спектральной области, где макрообразцы его не поглощают [1].

Возможность адресного щадящего воздействия излучения только на опухолевые клетки без разрушения здоровой ткани предоставляют вводимые в организм пациента биофункциональные комплексы нового поколения «аптамеры-наночастицы».

Синтетические олигонуклеотиды – аптамеры высокоспецифично связываются с комплементарными эпитопами белков-онкомаркеров, расположенных на мембране злокачественных клеток. Гипертермия опухоли происходит путем теплопередачи ей энергии лазерного излучения, поглощаемого в плазмонном резонансе (или в области плазмонного резонанса) наночастицами золота (при небольших повышениях температуры – до 42-43°С – происходит апоптоз, а при больших температурах – некроз злокачественных клеток) [1].

Пик плазмонного поглощения наночастиц золота определяется размерами (от 4 до 100 нм), формой (сферические, эллипсоидальные, «наностержни» или «нанодиски») и составом (золото, магнитные материалы или магнитные материалы, покрытые золотом) наночастиц, что позволяет выбрать необходимую терапевтическую длину волны лазера (диапазон от 530 до 1300 нм) [2].

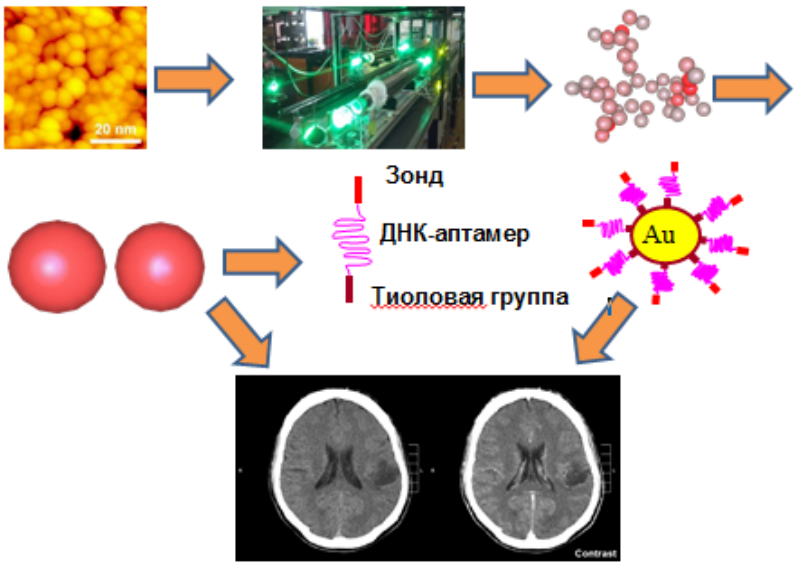

Рис. 1 - Схематическое изображение процесса гипертермии злокачественной опухоли при помощи биофункциональных нанокомплексов на основе частиц золота, модифицированных высокоспецифичными к опухоли аптамерами

Оптимальный режим излучения (длительность, интенсивность, длина волны) моделируется при помощи компьютерного софта, позволяющего исследовать оптические и структурные (оптодинамические) характеристики наноструктур. Таким образом, осуществляется такой режим нагрева наночастиц, что разрушительному термическому воздействию подвергается только пораженный участок.

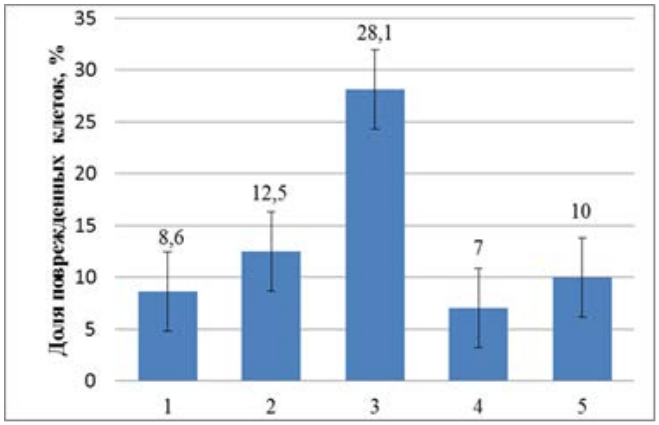

График 1 - Доля поврежденных асцитных клеток в разных экспериментальных образцах:
1 – асцитные клетки (контроль);
2 – асцитные клетки после 5-ти минутного облучения;
3 – асцитные клетки с конъюгатами наночастиц золота с ДНК-аптамерами после 5-ти минутного облучения;
4 – асцитные клетки с конъюгатами наночастиц золота с ДНК-аптамерами, не подвергавшиеся облучению;
5 – асцитные клетки с наночастицами золота после 5-ти минутного облучения

Полученные результаты свидетельствуют о способности биофункциональных частиц золота к повреждению клеточных мембран после воздействия лазером, тогда как в образцах, не содержащих аптамеры, доля поврежденных клеток близка к значениям контроля.

Плазмонно-резонансная фототермическая терапия представляет собой наименее инвазивный способ лечения злокачественных новообразований, в котором энергия фотонов преобразуется в тепловую энергию, достаточную для деструкции опухоли. Особенно перспективным является использование этого метода в тех случаях, когда оперативное удаление опухоли невозможно.

Добавление опухоль-специфичных аптамеров увеличивает специфичность фототермотерапии. Лазерное облучение асцитных клеток, связанных с наночастицами золота, повреждает их, оставляя невредимыми нормальные клетки. Для успешной гипертермии необходимо наличие в опухоли золотых наночастиц, но накопление золотых частиц в условиях in vivo происходит не только в опухоли, но и в здоровых тканях. Повышение чувствительности золотых наночастиц к опухоли с помощью аптамеров увеличивает накопление наночастиц в опухоли. Способность наночастиц золота связываться с опухолевыми клетками приводит к локализации наночастиц в опухоли, что необходимо для увеличения эффективности терапевтического воздействия.

Список литературы

1. Чумаков Д. С., Баско М. В., Дихт Н. И., Бучарская А. Б., Родионова Т. И., Терентюк Г. С. Апробация плазмонно-резонансной фототермической терапии злокачественных опухолей в условиях экспериментов in vivo // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9, № 4. С. 700–706.

2. Генфольд М. Л., Барчук А. С. Лазерная селективная гипертермия в лечении злокачественных новообразований. СПб. 2002. 13 с.

УДК 612.017.1:616.36

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОГО ГЕНЕЗА В ДИНАМИКЕ

Елманова Н.Г., Шангина Ю.С.
научные руководители д-р мед. наук Смирнова О.В., канд. биол. наук Титова Н.М.
Сибирский федеральный университет

Механическая желтуха — это осложнение патологических процессов, нарушающих отток желчи на различных уровнях желчевыводящих протоков. По причинам возникновения выделяют механическую желтуху доброкачественной и злокачественной этиологии. На долю механической желтухи доброкачественной этиологии приходится около80%. При механической желтухе происходит снижение системного клеточного, гуморального иммунитета, фагоцитарной способности лейкоцитов, бактерицидности сыворотки крови и других показателей неспецифической резистентности организма

В связи с этим, целью данного исследования явилось определить состояние гуморального звена иммунитета у больных механической желтухой доброкачественного генеза.

Задачи данного исследования: определение содержания Ig G, Ig M, Ig E и Ig A в плазме крови у больных механической желтухой доброкачественного генеза до операции и на седьмые стуки после нее.

Материалы и методы

Было обследовано 49 больных МЖ доброкачественного генеза в возрасте от 28 до 73 лет, поступивших в 1 хирургическое отделение ГКБ №6. Повторно, на седьмые сутки после операции было обследовано 11 больных МЖ доброкачественного генеза. Контрольную группу составили 125 практически здоровых лиц в возрасте от 25 до 75 лет, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. Материал для исследования - кровь (10 мл) из локтевой вены, забиралась утром натощак, в вакутейнеры с добавлением раствора гепарина натрия (5 ЕД/мл), перед операционным вмешательством при поступлении больного в хирургическое отделение.

Концентрация Ig A, Ig G, Ig M и Ig E в плазме крови у больных МЖ определялась с помощью метода иммуноферментного анализа (набор ОАО «Витал Девелопмент Корпорейшн»).

Статистическая обработка данных поводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, USA). Анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения проводился с использованием критерия Шапиро-Уилка. Описание выборки проводилось с помощью подсчета медианы (Me) и интерквантильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по критерию Манна-Уитни.

Результаты

Расчётные данные IgA у группы больных механической желтухой доброкачественного генеза до операции и у группы больных механической желтухой доброкачественного генеза на седьмые сутки после операции не имели статистически значимых отличии от контрольной группы и между собой.

Содержание IgM в плазме крови больных МЖ доброкачественного генеза на седьмые сутки после операции статистически достоверно было повышено по

сравнению с контрольной группой. Однако в сравнении с группой больных МЖ доброкачественного генеза до операции содержание IgM в плазме крови больных МХ доброкачественного генеза на седьмые сутки после операции статистически достоверно было снижено.

Уровень IgG в плазме крови больных МЖ доброкачественного генеза на седьмые сутки после операции статистически достоверно было повышено по сравнению с контрольной группой и с группой больных МЖ доброкачественного генеза до операции.

Показатели IgE в сравнении с контрольной группой статистически достоверно были повышены в плазме крови группы больных МЖ доброкачественного генеза как до операции, так и на седьмые сутки после операции. Однако уровень IgE в плазме крови больных МЖ доброкачественного генеза на седьмые сутки после операции по сравнению с группой больных МЖ доброкачественного генеза до операции статистически достоверно было повышено. У больных механической желтухой доброкачественного генеза до операции содержание IgA, IgM, и IgG не имели статистически значимого отличия от контрольной группы. А уровень IgE статистически достоверно повысился в сравнении с группой контроля.

Уровни Ig M, Ig G и Ig E в плазме крови были статистически достоверно повышены по сравнению с практически здоровыми людьми у больных МЖ доброкачественного генеза на седьмые сутки после операции. Содержание Ig M в сравнении с группой больных механической желтухой доброкачественного генеза до операции статистически достоверно было повышено у больных МЖ доброкачественного генеза на седьмые сутки после операции. Содержание Ig E по сравнению с контрольной группой у больных МЖ доброкачественного генеза на седьмые сутки после операции было статистически достоверно повышено. А(И) в сравнении с группой больных механической желтухой доброкачественного генеза уровень Ig E в плазме крови больных МЖ доброкачественного генеза на седьмые сутки после операции статистически достоверно было повышено.

Так как мы наблюдаем повышение уровней Ig M, Ig G и Ig E в сравнении с контролем, мы можем предположить, что у больных механической желтухой доброкачественного генеза острый хронический воспалительный процесс на фоне операции и эндотоксикоза. Перед операцией гуморальное звено иммунитета угнетено кроме токсико-аллергических реакций, однако после ее проведения наблюдается нормализация и восстановление иммунного ответа организма.

Список литературы

1. Tirsiu Constantin Jaundice Obstructuve Syndrom // Tirsiu Constantin / Current Health Sciences Journal - 2011 - No. 2. -Vol. 37. - C96 - 99

2. Плеханов А.Н. Соболева Н.И Новые подходы к исследованию иммунологического дисбаланса при печеночной недостаточности// А.Н. Плеханов Н.И. Соболева./ Медицинская Иммунология – 2007. - Т. 9. - № 6. - С. 563-568

УДК 612.017.1:616.36

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОГО ОПУХОЛЕВОГО ГЕНЕЗА В ДИНАМИКЕ

Елманова Н.Г.
научные руководители д-р мед. наук Смирнова О.В., канд. биол. наук Титова Н.М.
Сибирский федеральный университет

Механическая желтуха (МЖ) – это патологический синдром, развивающийся при нарушении функционирования системы оттока желчи. Согласно литературным данным, в основе неблагоприятного исхода лечения МЖ и увеличения числа осложнений лежит формирование печеночно-клеточной недостаточности и вторичного иммунодефицитного состояния, обусловленного снижением специфической и неспецифической реактивности организма. Также, одним из вариантов осложнений состояния механической желтухи может быть бактериальная инфекция [1, 3].

В связи с этим, целью данного исследования явилось определить состояние гуморального звена иммунитета у больных МЖ доброкачественного опухолевого генеза.

Задачи данного исследования: определение содержания Ig G, Ig M, Ig E и Ig A в плазме крови у больных механической желтухой доброкачественного опухолевого генеза до и на седьмые стуки после операции.

Материалы и методы

Было обследовано 13 больных МЖ доброкачественного опухолевого генеза в возрасте от 28 до 73 лет, поступивших в 1 хирургическое отделение ГКБ №6. Повторно, на седьмые сутки после операции было обследовано 6 больных МЖ доброкачественного опухолевого генеза. Контрольную группу составили 125 практически здоровых лиц в возрасте от 25 до 70 лет, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. Материал для исследования - кровь (10 мл) из локтевой вены, забиралась утром натощак, в вакутейнеры с добавлением раствора гепарина натрия (5 ЕД/мл), перед операционным вмешательством при поступлении больного в хирургическое отделение [2].

Концентрация Ig A, Ig G, Ig M и Ig E в плазме крови у больных МЖ определялась с помощью метода иммуноферментного анализа (набор ОАО «Витал Девелопмент Корпорейшн»).

Статистическая обработка данных поводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, USA). Анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения проводился с использованием критерия Шапиро-Уилка. Описание выборки проводилось с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 процентилей (C_{25} и C_{75}). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по критерию Манна-Уитни.

Результаты

У больных механической желтухой доброкачественного опухолевого генеза до операции содержание IgA, IgM, IgG и IgE не имели статистически значимого отличия от контрольной группы.

Уровни Ig A и Ig M в плазме крови были повышены по сравнению с практически здоровыми людьми у больных МЖ доброкачественного опухолевого генеза на седьмые сутки после операции. Содержание Ig A в плазме крови больных

механической желтухой доброкачественного опухолевого генеза статистически достоверно было повышено по сравнению с больными МЖ доброкачественного опухолевого генеза до операции. У больных МЖ доброкачественного опухолевого генеза на седьмые сутки после операции был снижен уровень Ig E по сравнению с контрольной группой и группой больных МЖ доброкачественного опухолевого генеза до операции.

Таким образом, у больных механической желтухой доброкачественного опухолевого генеза регистрируется острый воспалительный процесс, возможно инфекционной природы, на седьмые сутки после операции.

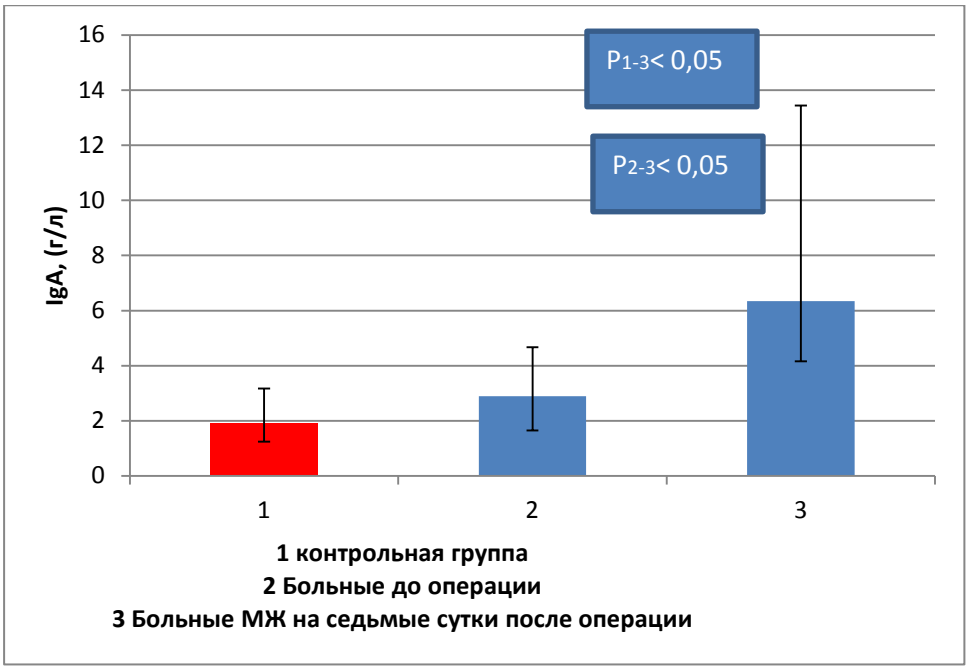

График 1 - Концентрация IgA в плазме крови

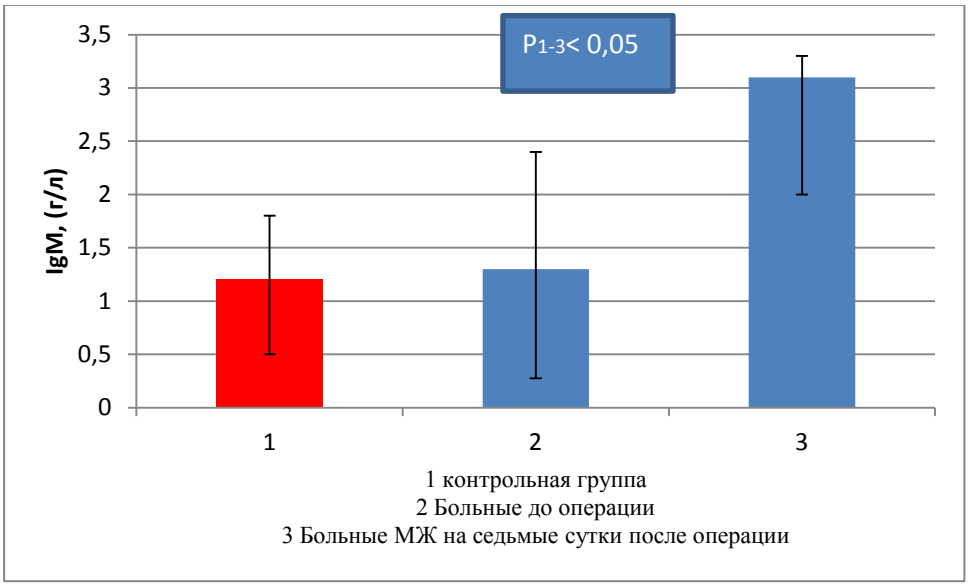

График 2 - Концентрация IgM в плазме крови

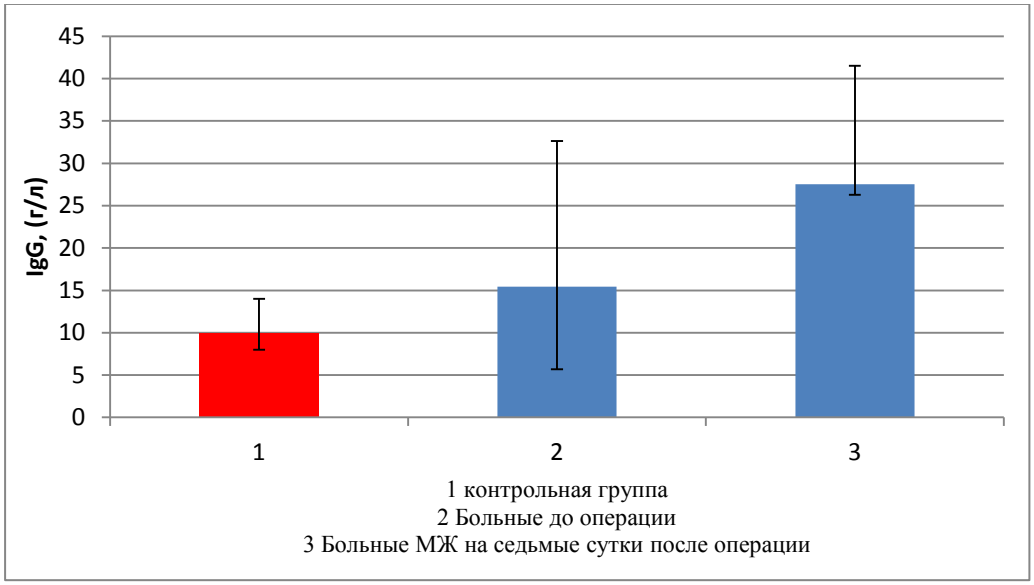

График 3 - Концентрация IgG в плазме крови

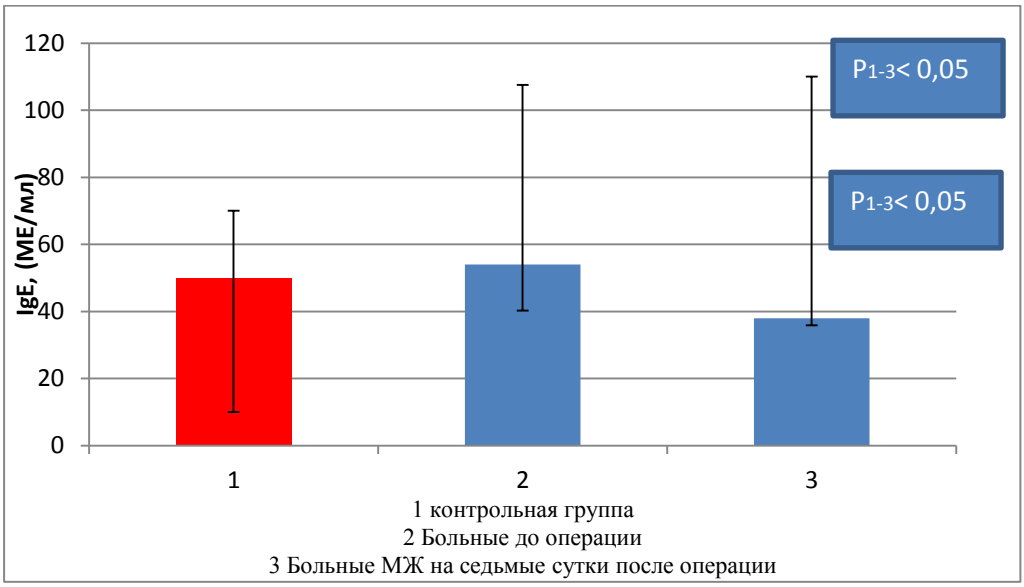

График 4 - Концентрация IgE в плазме крови

Список литературы

1. Гальперин Э.И., Момунова О.Н. Классификация тяжести механической желтухи // Хирургия. - 2014.- №1. - С. 5-9.

2. Смирнова О.В, Манчук В.Т., Агилова Ю.Н. Состояние иммунного статуса и особенности цитокиновой регуляции у больных на разных стадиях миеломной болезни / Фундаментальные исследования. – 2014. - №6-1. – С. 515;

3. Смирнова О.В., Титова Н.М., Манчук В.Т., Елманова Н.Г., Кочетова Л.В., Пахомова Р.А Особенности клеточного звена иммунитета у больных механической желтухой доброкачественного генеза в зависимости от уровня билирубина / Фундаментальные исследования/2015/№2-10. – С. 2174-2179.

УДК 616.155.392

АНАЛИЗ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ И МУТАЦИИ JAK2 V617F У ПАЦИЕНТОВ ДЕТЕЙ С ДИАГНОЗОМ ОСТРЫМ ЛЕЙКОЗОМ В КРАСНОЯРСКОМ КРАЕ

Карнюшка А.А.
научный руководитель канд. биол. наук, доц. Субботина Т.Н.
Сибирский федеральный университет,
Красноярский филиал гематологического научного центра МЗ РФ

У детей лейкозы составляют 30 – 35% всех злокачественных новообразований, наблюдающихся в возрасте до 15 лет. Примерно в 80% случаев возникает острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), прежде всего у детей 1 – 4 лет, а в 17% – острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). В генетической основе развития острых лейкозов (ОЛ) лежат структурные изменения в структуре хромосом (хромосомные аберрации). В зависимости от того какие хромосомные перестройки произошли, можно определить ход течения заболевания, его характер и лечение. В большинстве случаев при ОЛ встречается такой вид хромосомной аберрации, как транслокация. Хромосомные транслокации приводят к изменению экспрессии генов и/или к образованию слитых (химерных) генов, экспрессирующих химерные продукты (РНК и белки), которые могут служить как диагностическими маркерами, так и терапевтическими мишенями. Согласно исследованиям, проведенным рядом ученых соматическая мутация JAK2 V617F встречается у пациентов с ОМЛ с частотой от 1,8% до 28% в возрасте от 18 до 80 лет). [1, 2]. Ген JAK2 кодирует нерецепторную тирозинкиназу, участвующую в передачи сигнала от рецепторов цитокинов и факторов роста (эритропоэтин, тромбопоэтин, и др) к ядру клетки, и этот ген экспрессирован в ранних предшественниках гемопоэза. Соматическая мутация V617F в гене Янус–киназы–2 (JAK2) заключается в замене гуанина на тимин в положении 1849 экзона 14 на коротком плече хромосомы 9p24 и приводит к замене валина на фенилаланин в кодоне 617 положении полипептидной цепи JAK2, и вызывает нарушение структуры тирозинкиназы. JAK2 V617F осуществляет клональную пролиферацию клеток–предшественников миелоидного ростка кроветворения, но при этом не оказывает никакого влияния на ход заболевания. Мутация JAK2 V617F чаще встречается у пациентов с истиной полицитемией (ИС), эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) и идиопатическим миелофиброзом (ИМФ).

Таким образом, целью работы явился анализ хромосомных аберраций и мутации JAK2 V617F у пациентов детей с диагнозом ОЛ в Красноярском Крае.

В исследование включены данные обследования 84 детей с подтверждённым диагнозом лейкоз, находившихся на стационарном лечении в отделении онкологии и гематологии КГБУЗ «Красноярского краевого клинического центра охраны материнства и детства» (г. Красноярск) в период с 09.2012г по 02.2016г. Из них 62 ребёнка с диагнозом ОЛЛ, 20 – с диагнозом ОМЛ, 2 – с диагнозом хронический миелолейкоз (ХМЛ) и 1 пациент с диагнозом лимфома. Средний возраст пациентов составил 8 ± 4 лет. Выделение тотальной РНК проводили из клинического материала с помощью комплекта реагентов «РИБО-золь-D». Концентрацию РНК измеряли с использованием набора RNA HS AssayKit на флюориметре Qubit («Invitrogen»). Обратную транскрипцию и две стадии ПЦР проводили с помощью амплификатора IQ5 (Biorad). Продукты второй стадии ПЦР, содержащие флуоресцентную метку использовали для последующей визуализации результатов гибридизации на биологическом микрочипе «ЛК-БИОЧИП». Набор реагентов «ЛК-БИОЧИП»

предназначен для выявления и идентификации 13 основных хромосомных транслокаций при острых и хронических лейкозах. Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови и анализ JAK2 V617F методом ПЦР–РВ проводили с использованием реагентов НПО «Литех».

Из 84 пациентов мутации обнаружены у 30 детей. Среди 62 пациентов с ОЛЛ мутации выявлены у 17 детей (27% от всех случаев ОЛЛ). При этом химерный транскрипт ETV6-RUNX1 выявлен у 9 детей, MLL-AF4 – у 5, TCF3-PBX1 – у 2, BCR-ABL1 – у 1, что составило 52,9%, 29,4%, 11,8% и 5,9% от всех случаев ОЛЛ с мутациями, соответственно. Полученные данные по распространенности мутаций, обуславливающих ОЛЛ у детей в Красноярском Крае, значительно не отличаются от соответствующих данных литературы (табл. 1).

Таблица 1 - Распространенность мутаций, обуславливающих ОЛЛ у детей в Красноярском Крае и других регионах

Транслокация/ химерный транскрипт	t(12;21) ETV6-RUNX1 (%)	t(1;19) TCF3-PBX1 (%)	t(9;22) BCR-ABL1 (%)	t(4;11) MLL-AF4 (%)	t(11;19) MLL-ENL (%)	Не обнаружено (%)
Красноярск	15	3	1,6	8	1,6	70,8
Лит. данные	17 [3]	5 [4]	4 [4]	15 [3]	1 [3]	59

Химерный транскрипт ETV6-RUNX1 является наиболее распространенным не только среди детей с ОЛЛ в Красноярском крае, но и в других регионах. Данный химерный транскрипт имеет весьма благоприятное прогностическое значение, доля полных ремиссий приближается к 10%, подавляющее большинство переживают 5 лет. В отличие от него химерные транскрипты TCF3-PBX1, BCR-ABL1, MLL-AF4, MLL-ENL имеют неблагоприятные прогнозы.

Среди 20 пациентов с ОМЛ мутации выявлены у 12 человек (60% от всех случаев ОМЛ). При этом, химерный транскрипт RUNX1-RUNX1T1 выявлен у 4 детей, MLL-MLLT3 – у 3, MLL-MLLT10 – у 2, PML-RARA – у 1, CBFB-MYH11 у 1, MLL-MLLT1 у 1, что составило 33,3%, 25%, 16,8%, 8,3%, 8,3% и 8,3% от всех случаев ОМЛ с мутациями, соответственно. Полученные данные по распространенности мутаций, обуславливающих ОМЛ у детей в Красноярском Крае, также значительно не отличаются от соответствующих данных литературы (табл. 2).

Таблица 2 - Распространенность мутаций, обуславливающих ОМЛ у детей в Красноярском Крае и в других регионах

Транслокация/ химерный транскрипт	t(15;17) PML-RARA (%)	t(8;21) RUNX1-RUNX1T1 (%)	inv16 CBFB-MYH11 (%)	t(9;11) MLL-MLLT3 (%)	t(10;11) MLL-MLLT10 (%)	Не обнаружено (%)
Красноярск	5	20	5	15	10	45
Лит. данные	13 [6]	18 [5]	8 [4]	11[7]	3[4]	53

Наличие химерных транскриптов t(15;17) PML-RARA, t(8;21) RUNX1-RUNX1T1 и inv(16) CBFB-MYH11 имеют благоприятный прогноз, в отличие от химерных транскриптов t(10;11) MLL-MLLT10 и t(9;11) MLL-MLLT3. При анализе ДНК

пациентов с диагнозом ОМЛ на предмет наличия мутации V617F в гене JAK2 все образцы были отрицательны по данной мутации.

Таким образом, полученные данные по распространенности химерных транскриптов/транслокаций среди пациентов с ОЛ в Красноярском крае соответствуют литературным данным. Среди пациентов с диагнозом ОМЛ мутация JAK2 V617F не выявлена.

Список литературы

1. WookJekarl D., Han S. B., Kim M. и др. JAK2 V617F mutation in myelodysplastic syndrome, myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable, refractory anemia with ring sideroblasts with thrombocytosis, and acute myeloid leukemia, Korean J Hematol, 2010 Mar; 45(1): 46–50 [электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2983014/
2. Vicente C., Vázquez I., Marcotegui N и др. JAK2-V617F activating mutation in acute myeloid leukemia: prognostic impact and association with other molecular markers, Leukemia (2007) 21, 2386–2390 [электронный ресурс]. Режим доступа: http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2404812
3. Organista-Nava J., Gómez-Gómez Y., Illades-Aguiar B. и др. Survival of Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia, Published: April 17, 2013 under CC BY 3.0 license, Mexico [электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.intechopen.com/books/clinical-epidemiology-of-acute-lymphoblastic-leukemia-from-the-molecules-to-the-clinic/survival-of-patients-with-acute-lymphoblastic-leukemia
4. [электронный ресурс] Режим доступа: http://atlasgeneticsoncology.org
5. Reikvam H., Hatfield K. J., Kittang A. O. и др. Acute Myeloid Leukemia with the t(8;21) Translocation: Clinical Consequences and Biological Implications, Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2011 (2011), Article ID 104631, 23 pages
6. Grimwade D., Hills R.K., Moorman A.V., Walker H. и др. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials, Blood. 2010 Jul 22;116(3):354-65 [электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385793
7. Ilencikova D., Kolenova A. MLL Gene Alterations in Acute Myeloid Leukaemia (11q23/MLL+ AML), «Oncogene and Cancer - From Bench to Clinic", Slovakia, 2013 [электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.intechopen.com/books/oncogene-and-cancer-from-bench-to-clinic/mll-gene-alterations-in-acute-myeloid-leukaemia-11q23-mll-aml-
8. Воробьев А.И, Андреев Ю.Н., Баркаган З.С, и д.р Руководство по гематологии. 3-е издание. Том 3.

УДК 57.085;611.71;616-001

АДДИТИВНОЕ ПРОТОТИПИРОВАНИЕ КОСТНЫХ СТРУКТУР ИЗ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЬЮТЕРНОЙ ТОМОГРАФИИ

Кистерский К.А.
научный руководитель д-р биол. наук, проф. Шишацкая Е.И.
научный консультант д-р мед. наук, проф. Жестовская С.И.
Сибирский федеральный университет

В настоящее время процесс создания физической объёмной копии виртуальной модели значительно упрощен благодаря устройствам быстрого прототипирования, также известных как 3D принтеры.

Аддитивная печать начинает играть важную роль в здравоохранении. По данным Grand View Research, к 2020 году объём рынка 3D печати, связанной с медициной, будет составлять 1.1 миллиарда долларов, на основании высокой вероятности использования 3D принтеров для создания протезов различной сложности уже в ближайшее время.

Почти каждый из нас сталкивался с технологией BackUp в современных устройствах, работающей по принципу: в определённый промежуток времени пользователь создаёт контрольную точку, которая в свою очередь хранит всю важную информацию об устройстве, его настройках, а также файлах пользователя. Резервная копия устройства может храниться как на внутренней памяти ПК, так и на внешних носителях и даже в «облаке»; в нужный момент юзер может произвести восстановление девайса до состояния, заархивированного в процессе пользования. Человеческий организм не способен регенерировать органы, удалённые или значительно повреждённые. Данное суждение относится и к элементам костного скелета, их восстановление либо протекает медленно и связано с определёнными неудобствами, либо невозможно. Технология создания BackUp'ов для элементов человеческого организма в целом ещё не придумана.

Целью работы является аддитивное прототипирование костей человека с использованием поли-3-гидроксибутирата, ПЗГБ, на основе томографических снимков. Получение «синтетических костей» из биосовместимых и полностью биодеградируемых материалов с учетом индивидуальных анатомо-морфофункциональных особенностей пациентов является новым этапом в имплантологии и ортопедии. Объектом изучения на данном этапе работы стали люди без каких-либо патологий опорно-двигательного аппарата.

Аддитивное прототипирование позволяет получать изделия практически любой формы, размера. Данный метод идеально подходит для изготовления «штучных», индивидуальных конструкций и в то же время, он имеет ряд ограничений для изготовления однотипных деталей в больших объёмах. Так как качество печати зависит напрямую от комплекса факторов: скорости печати и охлаждения материалов, температуры экструдера и платформы, вентилируемости области печати, а также индивидуальных особенностей материала печати и самой модели. Было принято решение проводить исследование следующими стадиями:
1. Создание виртуальной модели некоторых костей человеческого организма;
2. Отработка технологий печати и настройка принтера Hercules Strong на стандартном для него полимере (ABS);
3. Получение прототипов костных структур из ABS;
4. Экструзия поли-3-гидроксибутирата (биосовместимый и биодеградируемый материал на основе гидроксикарбоновых кислот, далее – ПЗГБ) в изделия, пригодные

для печати 3D принтером Hercules Strong; 5. Отработка технологии печати и настройка принтера для печати прототипов костей из ПЗГБ.

Модель для печати можно получить двумя способами. Первый – использовать среднестатистические данные о размерах той или иной кости в данной возрастной и ростовой группе, для чего требуется значительный массив статистически достоверных данных. Второй – использование данных компьютерной томографии каждого пациента (далее КТ), что вполне доступно. Аппараты КТ МУЗ г.Красноярске позволяют делать снимки с точностью до 0,625 мм, программные комплексы позволяют вычленять виды ткани и отдельные объекты, сохранять полученные данные в виде моделей. Разрешение полученных деталей составляет 4,064 пикселя на 1 дюйм в трёх плоскостях, что альтернативно 5,747 векселя на дюйм. Так же к плюсам можно отнести распространенность формата DICOM, количество программ для просмотра и редактуры итоговых снимков. Ограничением подхода является наличие у пациента остеопороза, когда сниженная и неравномерная плотность костной ткани не позволяет программным комплексам корректно моделировать имеющуюся структуру кости; в таком случае рекомендован подход «замены» - использование модели аналогичной кости пациента без остеопороза.

Полученные КТ-снимки обрабатываются с программными комплексами для получения вычлененного объекта, сохраняются в формате .stl (стандарт для объёмных моделей любого типа). Данный формат используют практически все редакторы 3D структур, а также программное обеспечение (далее – ПО) принтера. Сам же принтер использует только .gcode, следовательно, необходимо конвертировать модель; также ведутся поиски программ, способных увеличить разрешение снимка, что позволит повысить качество компьютерной модели и прототипов.

Рис. 1 - Процесс создания модели кубовидной кости правой ноги человека

При печати используется послойное наплавление материала (далее – FDM). Именно FDM позволяет наносить полимер без изменения химической структуры ПЗГБ и использования клеящего материала. Пруток полимера с бобины по тефлоновой трубке проходит в сопло миниэкструдера, двигаясь по x и y осям, печатает слой заданной толщины. При этом платформа сдвигается в оси z, давая новый слой для печати. Данная технология не даёт возможности печатать «на воздухе», т.е. на весу. Соответственно модель, имеющая сложную структуру, не может быть напечатана без

«строительных лесов», или поддерживающего материала. Для этого так же существует ряд программ, упрощающих печать.

Для печати непосредственно ПЗГБ необходим пруток диаметром 1,75 мм, получение которого и является первоочередной задачей, для решения которой разрабатывается поэтапного перерабатывания порошок-гель-расплав.

Промежуточный итог работы – напечатанные на основе ABS-полимера модели костей скелета человека, с использованием базы данных Краевой клинической больницы №1 г. Красноярска. На следующем этапе будет проведена комплексная оценка экспериментальных имплантатов в соответствии с российскими и международными стандартами для имплантатов - изделий медицинского назначения 3 класса, обладающих высоким индивидуальным риском, что особенно важно для детей и людей старшего возраста, в случаях хирургического лечения опорно-двигательного аппарата.

Рисунок 2 - Напечатанная из ABS-пластика половинка кубовидной кости правой ноги человека

Список литературы

1. Татарников О. Атака клонов! 3D-сканирование и трехмерная печать. Журн. Компьютерпресс, №7, 2003 С. 9–14.
2. Александров В.В., Александрова В.В., Зайцева А.А., Хурс С.П.. Цифровая технология 3D промышленного производства. Труды СПИИРАН. 2010. №15. С. 85-94.
3. Волова Т.Г., Гончаров Д.Б., Суковатый А.Г., Шишацкая Е.И.. Влияние параметров электростатического формирования на характеристики наноматриксов из разрушаемых полиэфиров биопластотан. Журн. Пластические массы. 2013. №7. С. 53-56.
4. Лучевая диагностика. Учебное пособие. Т.1. под ред. Проф. Труфанова Г.Е. 2011. 416 с.
5. Лебедев В.В., Крылов В.В., Тиссен Т.П., Халчевский В.М.. Компьютерная томография в неотложной нейрохирургии Учебное пособие. М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. 360 с.

6. Arcam – шведский лидер 3D-печатной революции [электронный ресурс]. Режим доступа: http://3dtoday.ru/industry/arcam-shvedskiy-lider-3d-pechatnoy-revolyutsii.html

УДК 613.954.4

ОЦЕНКА ФИЗИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

Конева М.С.
научный руководитель канд. техн. наук, доц. Бугаец Н.А.
Кубанский государственный технологический университет

Состояние здоровья детей – достаточно важный показатель не только настоящего, но и будущего благополучия общества и государства. Здоровье детей и подростков во многом зависит от качества среды обитания, уровня развития образования, условия обучения, воспитания, оганизации медицинского обеспечения и многих других факторов. К числу основных факторов, негативно воздействующих на состояние здоровья детей, относятся гиподинамия, переутомление, вредные привычки, нарушение питания [1,2].

Как показывают научные исследования, нарушения в организации питания в раннем возрасте становятся причиной возникновения серьезных заболеваний функциональных систем организма во взрослом состоянии [3].

По данным официальной статистики, неудовлетворительное питание детей раннего возраста привело за последние годы к росту алиментарно-зависимых заболеваний: рахита и паратрофии – в 2 раза, анемии – в 1,5 раза. В отдельных регионах анемией страдают около 50 % детей раннего возраста, что вызывает отдельную тревогу, так как с железодефицитными анемиями связан целый комплекс нарушений здоровья (снижение иммунитета, нарушения физического и нервно-психического развития). Болезни крови, кроветворных органов и системы кровообращения распространенные заболевания детского населения и Краснодарского края (таблица 1)[4].

Таблица 1 – Динамика общей заболеваемости детского населения 0-14 лет

Наименование классов болезней	Показатель на 1000 населения соответствующего возраста				
	2010	2011	2012	2013	2014
Всего	**1695,37**	**1757,91**	**1796,18**	**1778,39**	**1725,82**
в том числе некоторые инфекционные и паразитарные болезни	65,51	58,21	59,70	59,64	56,08
новообразования	7,36	7,85	8,00	7,98	7,83
болезни крови, кроветворных органов	**19,17**	**16,71**	**17,20**	**15,90**	**14,29**
болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ	19,98	20,59	20,90	20,75	20,27
болезни нервной системы	90,65	91,64	93,20	87,39	84,11
болезни глаза и его придаточного аппарата	77,50	81,05	84,80	84,17	85,64
болезни уха и сосцевидного отростка	46,57	52,94	53,60	51,23	48,77
болезни системы кровообращения	**16,54**	**16,49**	**16,80**	**16,14**	**16,04**
болезни органов дыхания	824,09	893,47	892,40	895,62	884,50

Продолжение таблицы 1

Наименование классов болезней	Показатель на 1000 населения соответствующего возраста				
	2010	2011	2012	2013	2014
болезни кожи и подкожной клетчатки	77,74	76,30	80,50	83,87	79,78
болезни органов пищеварения	142,98	154,04	160,30	152,60	144,07
болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани	69,74	72,30	68,80	67,88	66,59
болезни мочеполовой системы	37,65	37,25	37,20	37,19	34,83

Целью исследования является оценка физического развития детей дошкольного возраста города Краснодара.

Проведен анализ 427 медицинских карт ребенка (форма 026/у-2000).Медиана возраста вошедших в исследование пациентов составила 2 года 9 месяцев (от 10 месяцев до 6 лет 4 месяцев). Из 427 детей – 200(47 %) лиц мужского пола и 227 (53 %) женского.

Оценку физического развитиядошкольников проводили по показателям длины и массы тела центильным методом и сравнивались с межрегиональными центильными таблицами распределения длины и массы тела по возрасту.

Центильные таблицы для оценки физического развития ребенка представляют своеобразную «математическую фотографию» распределения большого количества детей по возрастающим показателям роста, массы, окружности груди и головы.

Колонки центильных таблиц показывают количественные границы признака у определенной доли (процента, центиля) детей данного возраста и пола. При этом за средние или строго нормальные величины принимают значения, свойственные половине здоровых детей данного пола и возраста, что соответствует интервалу 25-50-75 %.

Интервалы, которые находятся рядом со средними показателями, оцениваются как ниже и выше среднего (соответственно 10-25 % и 75-90 %). Эти показатели родителям также можно расценивать как нормальные.

Если же показатель попадает в зону 3-10 или 90-97 %, следует насторожиться и указать на это врачу. Это – зона внимания, требующая дополнительных консультаций и обследования. Если же показатель ребенка выходит за значения 3 или 97 %, весьма вероятно, что у ребенка есть какая-то патология, отразившаяся на показателях его физического развития [5].

Из данных медицинских карт установлено, что физическое развитие в норме по показателям длины и массы тела наблюдается всего лишь у 26,5 % мальчиков и 27,75 % девочек.В тоже время показатель ребенка, который выходит за значение 97 % и по длине и массе тела составляет 9,5 % у мальчиков и 4,4 % – у девочек.

Произведено и распределение детей по группам здоровья (рис. 1 и 2).

К 1 группе здоровья относится 64,75 % девочек и 52 % мальчиков, не имеющих отклонений по всем критериям оценки здоровья, с нормальным психическим и физическим развитием, которые редко болеют и в момент обследование совершенно здоровы.

2 группу здоровья составляют здоровые дети, но имеющие небольшой риск развития хронических заболеваний, к ней относятся 42% мальчиков и 30,80 % девочек.

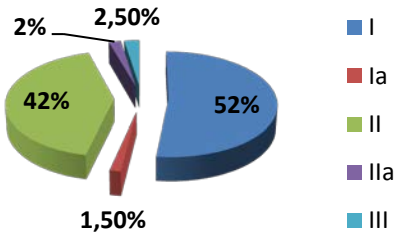

Рис. 1 – Распределение мальчиков по группам здоровья

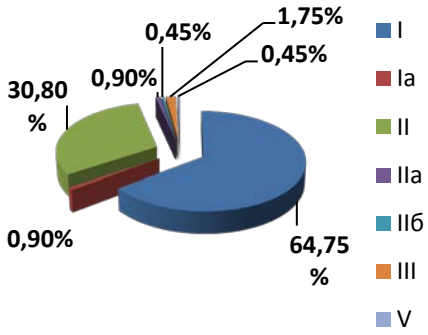

Рис. 2 – Распределение девочек по группам здоровья

В этой группе здоровья выделяют 2 подгруппы:

- группа 2а – здоровые дети, не имеющие тяжелой наследственности, но во время беременности или в процессе родов были какие-либо осложнения (2 % мальчиков и 0,90 %девочек);

- группа 2б –дети, которые часто болеют (более 4 раз в год) и имеют некоторые функциональные отклонения с возможным риском развития хронических заболеваний(0,45 % девочек).

Дети, входящие в 3 группу здоровья и имеющие хронические заболевания или врожденную патологию с редким проявлением легкого обострения, которое не сказывается на общем самочувствие и поведении ребенка, среди мальчиков 2,5 %, девочек – 1,75 %. 0,45 % девочек отнесены к 5 группе здоровья, характеризующейся наличием хронических заболеваний или тяжелых пороков развития с существенно сниженными функциональными возможностями.

Данные исследования свидетельствуют о наличии отклонений в физическом развитии и здоровье детей дошкольного возраста. Обобщение и анализ материалов по статистике здоровья детей способствует целенаправленному поиску мер, разработке и внедрению в рацион детей специализированных продуктов питания для предотвращения заболеваний и поддержания здорового образа жизни.

Список литературы

1.Конь И.Я., Волкова Л.Ю., Коростелева М.М., Георгиева О.В., Зейгарник М.В.Современные представления о продуктах питания для детей дошкольного и школьного возраста //Вопросы детской диетологии, 2010. Т. 8.№6. С. 35-38.

2. Иванова И.Л., Ковальук В.К. Гигиенические аспекты возникновения соматической патологии желудочно-кишечного тракта (обзор литературы) //Гигиена и санитария, 2009.№3. С. 89-91.

3. Макеева А.Г. Формирование основ культуры питания у дошкольников//Детский сад: теория и практика, 2014. №8. С. 22-27.

4. Приложение к докладу«О состоянии здоровья населения и организации здравоохранения Краснодарского края по итогам деятельности за 2014 год»: сборник статистических данных. Краснодар: ГБУЗ МИАЦ, 2015. 136 с.

5. Центильные таблицы физического развития детей [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.babyblog.ru/user/Modniza/3008292

УДК 616.155.53

АНАЛИЗ ТРОМБОГЕННЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ II И V ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ОПУХОЛЯМИ

Кочмарева Г.Ю.
научный руководитель канд. биол. наук, доц. Субботина Т.Н.
Сибирский федеральный университет,
Красноярский филиал гематологического научного центра МЗ РФ

Тромботические осложнения представляют серьезную проблему при хронических миелопролиферативных опухолях (ХМО), таких как истинная полицетемия (ИП), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), первичный и вторичный миелофиброз (МФ). Развитие заболеваний для большинства пациентов данной группы обусловлено возникновением соматической мутации V617F в гене Янус-киназы-2 (JAK2), открытой в 2005 году. Ряд исследований показал, что мутация JAK2 V617F увеличивает риск тромбообразований у больных с ХМО [1], [2]. В 2006 году были обнаружены соматические точечные мутации W515L и W515K в гене рецептора тромбопоэтина MPL, которые выявляются у 4–8% пациентов с диагнозом ЭТ и МФ [3]. В конце 2013 года были обнаружены новые мутации в гене кальретикулина (CALR), связанные с развитием ЭТ и первичным миелофиброзом. Для пациентов с наличием данных мутаций отмечают гиперклеточность костного мозга, склонность к тромбозам и геморрагиям, риск лейкозной трансформации и развитие фиброза в процессе эволюции болезни [4]. Таким образом, у больных с ХМО повышается риск развития как венозных, так и артериальных тромбозов, при этом нередко заболевание сопровождается острым нарушением мозгового кровообращения, острым инфарктом миокарда, тромбозами глубоких вен.

Кроме того, важную роль в развитии тромботических осложнений у пациентов с ХМО могут иметь не только обуславливающие данное заболевание соматические мутации, но и наследственные факторы риска, предрасполагающие к повышенной активности плазменного звена гемостаза. Так, согласно исследованиям, проведенным Mihaela Tevet и другими учеными в 2015 году [5] было проанализировано 192 пациента с диагнозом ХМО, из которых мутация V617F в JAK2 присутствовала у 62,8% больных из всей выборки, в частности у 97,6% пациентов с ИП, 54,5% с ЭТ и 53,44% пациента с МФ. Пациенты с мутацией имели относительный риск (RR) тромбозов 2,94 по сравнению с пациентами без мутаций, у которых RR составил 0,93. У тех пациентов, которые имели как мутацию, так и тромбогенные полиморфизмы, в частности мутации в генах II и V факторов свертывания крови RR составил 3,56 по сравнению с пациентами без мутаций, что подтверждает аддитивное взаимодействие этих двух факторов риска.

Таким образом, цель настоящего исследования – анализ полиморфизмов в генах II и V факторов свертывания крови у пациентов с диагнозом ХМО.

В качестве объекта исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови пациентов с использованием набора реагентов «SNP – экспресс» (НПО «Литех»). С выделенной ДНК проводили полимеразную цепную реакцию с детекцией результата в режиме реального времени также с использованием реагентов фирмы Литех.

В исследование были включены 70 пациентов с подтверждённым диагнозом ХМО, которые ранее поступали на консультативный прием врачей-гематологов в амбулаторно-поликлинические учреждения г. Красноярска и в Красноярскую краевую

клиническую больницу. Также для данных пациентов в лаборатории Красноярского филиала Гематологического центра ранее был проведен анализ на наличие соматических мутаций, обуславливающих развитие ХМО, в частности: 43 пациента имеют мутацию V617F в гене JAK2, 10 – в гене MPL (W515L у 8 пациентов, W515K у 2 пациентов) и 4 – в гене CALR (инсерция – у двух пациентов, делеции – у двух пациентов). У 13 человек не выявлено мутаций, обуславливающих развитие ХМО.

В ходе данной работы все участники тестировались на наличие тромбогенных полиморфизмов в генах коагуляционного фактора II – протромбина (FII, 20210 G->A; rs1799963) и фактора V – генотип Leiden (FV, 1691 G->A; rs6025). При обследовании 70 пациентов с диагнозом ХМО мутация в гене FII выявлена у одного человека. Данный пациент имеет диагноз ЭТ, обусловленный мутацией W515L в гене MPL. Мутация в гене FV выявлена у двух пациентов, один из них имеет диагноз ЭТ, обусловленный мутацией W515L в гене MPL, другой пациент имеет диагноз ИП, но у него отсутствуют анализируемые нами соматические мутации, обуславливающие ХМО. В таблице 1 приведена клинико-гематологическая характеристика пациентов с мутациями в генах II и V факторов свертывания крови.

Таблица 1 – клинико-гематологическая характеристика пациентов с ХМО, имеющих сочетанные мутации в генах II и V факторов свертывания крови

№	Пол	Год рождения	Группа крови	Сом. мутация	Тромбо-генный полиморфизм	Диагноз уточненный	Терапия	Тромботи-ческие осложнения
1	м	1942	-	MPLW515L	FII	ЭТ	Интерферон альфа	нет
2	ж	1954	A(II)	MPLW515L	FV	ЭТ	Гидроксикарбамид	Инсульт атеротромботический
3	м	1958	B(III)	мутаций не обнаружено	FV	ИП	Дезагреганты	нет

На настоящий момент у одной пациентки из трех имеются тромботические осложнения. Больная была на приеме разово в конце 2013 года в тяжёлом послеинсультном состоянии (частичная парализация). У двух других пациентов с выявленными тромбогенными полиморфизмами на настоящий момент отсутствуют выраженные тромботические осложнения.

Таким образом, при ведении пациентов с наличием сочетанных мутаций (соматических мутаций, обуславливающих ХМО и тромбогенных полиморфизмов) необходимо учитывать, что у таких пациентов ещё более увеличен риск развития венозных тромбозов.

Список литературы

1. Colaizzo D, Amitrano L, Tiscia GL, и др.The JAK2 V617F mutation frequently occurs in patients with portal and mesenteric venous thrombosis.(2007) J Thromb Haemost 5:55–61.

2. Yusuf Bayraktar, Ozgur Harmanci, Ferhun Balkanciидр. JAK2V617F Mutation in Patients with Portal Vein Thrombosis, Dig Dis Sci (2008) 53:2778–278

3. К. М. Абдулкадыров, С. С. Бессмельцев. Вестник гематологии, том 10 № 1 2014, Санкт-Петербург 2014.

4. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN и др. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms, Blood 2011;118:1723-35 5.Mihaela Tevet, Razvan Ionescu, Cornel Dragan. Influence of the JAK2 V617F Mutation and inherited thrombophilia on the thrombotic risk among patients with myeloproliferative disorders, Maedica (Buchar), 2015 Mar. Режим доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4496761/

УДК 616.33-002.27

ГЛУТАТИОННЫЙ СТАТУС ПЛАЗМЫ КРОВИ У БОЛЬНЫХ АТРОФИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ

Круглякова М.В.
научный руководитель канд. биол. наук Титова Н.М.
Сибирский федеральный университет

Атрофический гастрит – один из видов гастрита, характеризуется истончением слизистой оболочки желудка. Это заболевание нашло широкое распространение в современном мире, более половины всего населения планеты имеет ту или иную форму гастрита[ ].

Важная роль в большинстве организмов отводится кислороду, участвующему в процессах метаболизма, сигналинга и ряда физиологических фукции. После ряда унивалентных восстановлений, он поэтапно может превратиться в активные формы кислорода (АФК): супероксидный анионрадикал, пероксид водорода, гидрооксильный радикал и др. высокореакционные соединения [ ].

При большой концентрации АФК могут оказывать токсическое влияние на клетки, инициируя перекисное окисление липидов (ПОЛ) [ ]. В устранении избытка АФК и продуктов ПОЛ, важное значение принадлежит глутатионовой антиоксидантной системе, представленной в организме восстановленным глутатионом, и ферментами – глутатионпероксидазой (ГПО) и глутатион-S-трансферазой (GST) [ ].

Цель работы: изучить характер изменения состояния глутатионовой антиоксидантной системы в плазме крови больных атрофическим гастритом.

Методы

Перекисное окисление липидов оценивали по уровню вторичного продукта – малонового диальдегида (МДА). Состояние глутатионовой антиоксидантной системы по активности ферментов – ГПО, GST.

Результаты исследования

Малоновый диальдегид является продуктом перекисного окисления липидов и служит маркером процессов радикального окисления, запускаемых в клетках активными формами кислорода. Результаты исследования МДА в плазме крови у больных атрофическим гастритом представлены на графике 1.

У больных атрофическим гастритом в плазме крови содержание MDA достоверно превышает контрольный показатель на 200%.

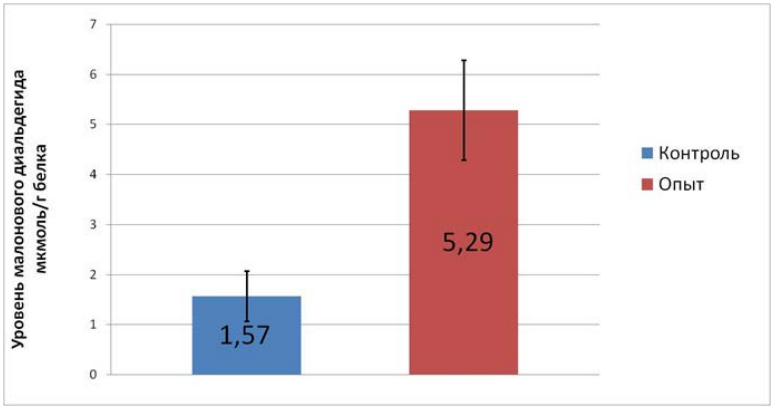

График 1 – Содержание малонового диальдегида в плазме крови здоровых людей и больных атрофическим гастритом

МДА – высокореакционное соединение способное образовывать аддукты с белками, углеводами и нуклеиновыми кислотами, приводя к потере их биологических активности.

Известно, что в плазме крови основным объектом ПОЛ служат липопротеины, защиту которых осуществляют антиокидантные компоненты плазмы крови [ ].

Селенсодержащая глутатионпероксидаза способна эффективно разлагать гидроперекиси липидов и перекись водорода. Её сродство к перекиси водорода выше, чем у каталазы, поэтому первая более эффективно работает при низких концентрациях перекиси. ГПО катализирует реакцию разложения перекиси водорода до воды, используя восстановленный глутатион в качестве донора, при этом происходит окисление глутатиона с образованием конъюгированной формы GSSG [ ].

На графике 2 представлены результаты исследования активности ГПО у здоровых людей и больных атрофическим гастритом.

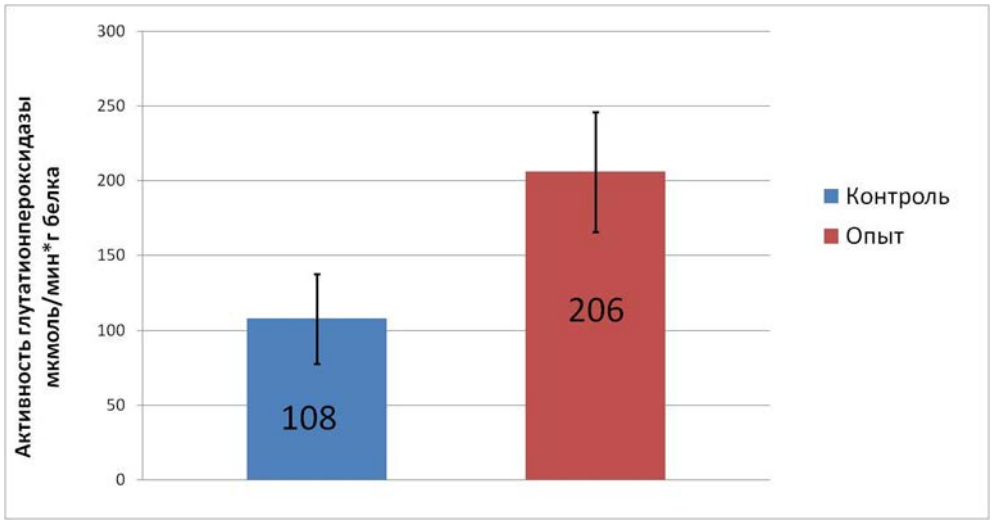

График 2 – Активность глутатионпероксидазы в плазме крови здоровых людей и больных атрофическим гастритом

Согласно полученным данным активность ГПО в плазме крови у больных атрофическим гастритом достоверно превышает аналогичный показатель у здоровых людей на 91%.

В целом антиоксидантный эффект ГПО проявляется в том, что ферменты предотвращают продолжение цепей ПОЛ, с одной стороны, обезвреживая уже образовавшиеся гидроперекиси жирных кислот, и предупреждая их образование путем расщепления H2O2 – с другой. В частности, ГПО принадлежит активная роль в защите липопротеинов плазмы крови от пероксидного окисления [ ].

Наряду с ГПО в плазме присутствует и глутатион-S-трансфераза, способная восстанавливать гидроперокси-группы окисленных фосфолипидов непосредственно в мембранах без их предварительного фосфолипидного гидролиза свободными жирными кислотами. Этот фермент конъюгирует с глутатионом токсичные продукты ПОЛ (ноненали, децинали, холестерин-6-оксид), тем самым способствуют их выведению из организма. Таким образом, GST является важным компонентом антиоксидантной защиты, особенно от эндогенных метаболитов, образующих при окислительном стрессе [ ].

Результаты определения активности этого фермента приведены на графике 3.

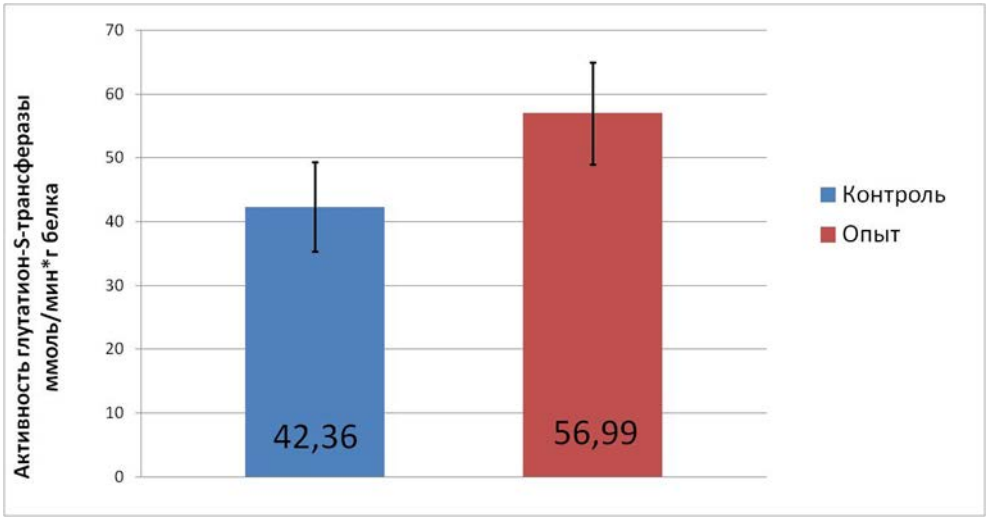

График 3 – Активность глутатион-S-трансферазы в плазме крови здоровых людей и больных атрофическим гастритом

При атрофическом гастрите в плазме крови наблюдалась тенденция к повышению активности GST на 34%, по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы, что может служить косвенным свидетельствовом об увеличение содержания токсичных продуктов ПОЛ.

Таким образом, в плазме крови больных атрофческим гастритом создаются условия пероксидного стресса, характеризующиеся высоким уровнем МДА. Повышенная активность ГПО и GST недостаточна для естранения АФК и как следствие процессов липопероксидации, что приводит к появлению в плазме крови окисленных липопротеиновых частиц.

Список литературы

1. Колодей, Е. Н. Актуальные вопросы диагностики и лечения гастрита типа В / Е. Н. Колодей // Мир фармации и медицины. – 2012. – № 22. – 255 с.
2. Артюхов, В. Г. Биологические мембраны (структурная организация, функции, модификация физико–химическими агентами) / В. Г. Артюхов – Воронеж: Воронежского ун-та, 2000. – 296 с.
3. Барабой, В. А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В. А Барабой // Успехи современной биологии. – 1991. – Т.111, №.6. – С.21-28.
4. Толпыгина О. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты (обзор) / О.А. Толпыги- на // Бюллетен Восточно – сибирского научного центра. — 2012. — 2 (84), Часть 2. — С. 178-181
5. Дубинина, Е. Е. Антиоксидантная система плазмы крови / Е. Е. Дубинина // Украинский биохимический журнал. – 1992. – Т.64, №2. – С.3-15.
6. Zhang, L.P. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases / L.P. Zhang. // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – V.1006. – P.140-143.
7. Барабой, В. А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В. А Барабой // Успехи современной биологии. – 1991. – Т.111, №.6. – С.21-28.
8. Hayes, J.D. Glutathione transferases / J.D. Hayes [et al] // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2005. – V.45. – P. 51-88.

УДК 574.24

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТЕХНОГЕННОЙ НАГРУЗКИ ГОРОДА НОРИЛЬСКА НА ПОКЗАТЕЛИ КРОВИ И МЕТАБОЛИЗМ ЭРИТРОЦИТОВ МЫШЕЙ

Лескова И.Б.
научный руководитель канд. биол. наук, доц. Акопова Ю.С.
Сибирский федеральный университет

На фоне сложных природно-климатических условий экологическая ситуация в городе Норильске чрезвычайно серьезна. Концентрации ряда загрязняющих веществ превышают значения ПДК. По диоксиду серы – в 7 раз, по оксиду никеля – в 2,15 раза, по диоксиду азота – 1,4 раза, по оксиду меди – в 2,25 раза [1]. Токсические газы могут вызывать отек легких, ацидоз, опухоли различных органов (в основном легких), бронхиты и т.д. Многие поллютанты способны вызывать генетические мутации.

Цель настоящего исследования оценить влияние производственных выбросов города Норильска на показатели крови и метаболические особенности эритроциты лабораторных мышей.

Объектом исследования являлась кровь лабораторных мышей самок ICR. Всего обследовано 20 самок мышей (9-ти месячных в конце исследования): 10 – проживали 6 месяцев в г. Норильске, 10 контрольных – в виварии ВУЗа.

Концентрацию глюкозы в плазме крови определяли гексокиназо-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназным энзиматическим референтным методом. Концентрацию лактата в плазме крови определяли энзиматическим колориметрическим методом. Количество лейкоцитов подсчитывалось на мазке крови. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ определялась биолюминесцентным методом [2]. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы “Statistica 7,0”. Высчитывались медиана (Me) и интерквартальный разброс в виде подсчета 25- (C25) и 75-перцентилей (C75). Для проверки гипотезы о статистической достоверности двух выборок использовался непараметрический метод с помощью критерия Манна-Уитни.

В результате исследования обнаружено, что концентрация глюкозы у мышей, живших в г. Норильске, достоверно увеличивается - 12,28 (12,04; 16,78) ммоль/л по сравнению с контрольной группой 9,53 (9,40; 10;61), при P=0,009. Уровень лактата в плазме также достоверно увеличивается - 8,90 (8,60; 9,00) ммоль/л, в отличие от контрольной 6,94 (6,60; 7,70), P=0,008. Изучение лейкоцитарной формулы показало, что среди показателей у мышей, живших в Норильске, достоверно увеличивается число палочкоядерных нейтрофилов - 12 (8; 13) по сравнению с контрольной группой мышей - 4 (3; 6), при P=0,009.

Можно предположить, что такие изменения в крови мышей, подвергшихся воздействию неблагоприятной окружающей среды города Норильска, наблюдаются на фоне интоксикации организма раздражающими газами - оксид серы и оксида азота, концентрация которых, в городе Норильске превышает ПДК в 7 и 1,5 раза соответственно. Вследствие такого воздействия может снижаться жизненная емкость легких, недостаточное поступление кислорода. В такой ситуации анаэробный гликолиз преобладает над аэробным, при этом катаболизм глюкозы осуществляется до молочной кислоты [3].

Оксиды серы и азота, связываясь со слюной, преобразуются в кислоты и поступают во многие органы. Воздействие поллютантов также способствуют развитию злокачественных новообразований и повышению палочкоядерных нейтрофилов в крови [4]. Кроме того рост концентрации глюкозы в крови мышей может быть результатом влияния техногенной нагрузки на печень.

Изучение метаболизма эритроцитов крови мышей, подвергшихся воздействию техногенной нагрузки города Норильска, позволило обнаружить достоверное повышение активности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ) - 0,400 (0,340;0,440) в эритроцитах крови по сравнению с группой контроля - 0,045 (0,043;0,047), при P=0,009. Уровень активности глутатионредуктазы (ГР) в эритроцитах экспериментальной группы мышей также достоверно увеличивается - 3,840 (3,644;5,475) в отличие от контрольной - 2,186 (1,912;2,197), P=0,009. На ряду с этим, у мышей, испытавших воздействие поллютантов, наблюдается достоверное снижение активности анаэробной реакции лактатдегидрогеназы (обр.ЛДГ): экспериментальная группа - 26,560 (25,291;27,500); контрольная - 69,015 (65,986;85,279), P=0,009.

Поскольку в эритроцитах отсутствуют митохондрии, наличие фермента Г3ФДГ в эритроцитах носит явление остаточного характера [5]. Возможно, повышение активности Г3ФДГ может происходить на уровне ретикулоцитов. Продукт реакции ГР - восстановленный глутатион участвует в нейтрализации перекисей. Увеличение активности ГР можно связать с адаптационной реакцией в эритроцитах мышей в ответ на влияние токсинов. Ингибировать активность обр. ЛДГ способны тяжелые металлы, непосредственно связываясь с сульфгидрильной группой (SH-группой) фермента. Понижение уровня обр.ЛДГ приведет к накоплению лактата в эритроцитах.

Таким образом, под воздействием техногенной нагрузки в г. Норильске у мышей наблюдается лактацидоз, с возможной нехваткой дыхания, а также повышение палочкоядерных нейтрофилов и уровня глюкозы в крови с возможными предпосылками развития онкологических процессов. В эритроцитах мышей с одной стороны отмечается активация адаптационных процессов, с другой стороны - понижение энергетических возможностей, нарушение ионного баланса с последующим сокращением продолжительности жизни клеток.

Список литературы

1. Отчет о мониторинге влияния выбросов ЗФ ОАО «ГМК «Норильский никель» на окружающую среду/ Л.Е. Березова [и др.]. - Новосибирск, -2012. 134с.

2. Савченко А.А. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ человека биолюминесцентным методом/А.А. Савченко, Л.Н. Сунцова//Лабораторное дело.-1989.-№11.-С.23-25.

3. Roumen, R.M.H. Scoring systems and blood lactate concentration in relation to the development of adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure in severely traumatized patients./ Roumen R.M.H, Redl H.R., Schlag G. et al// J Trauma. -1993. -№ 35. – P.349-355.

4. Stellman, J.M. Обзор химических соединений. / Jeane Mager Stellman, Debra Osinsky, Pia Markkanen// В 5 т. Т. 4. Энциклопедии по охране и безопасности труда.– Москва,1998. - Гл. 104. - С. 484-506.

5. Северин, Е. С. Биохимия. / Северин Е.С., Алейникова Т.Н., Осипов Е.О. - Москва: Медицина, 2000. - С. 367.

УДК 57.041

ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОТНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ПАТОЛОГИИ

Милевская С. В., Туник С. В., Павлов И. А.
научный руководитель канд. биол. наук Гершкорон Ф. А.
Сибирский федеральный университет

Проблема стресса на сегодняшний день сохраняет высокую медико-социальную значимость (1). Тироксин - гормон стресса, повышающий обмен веществ и ускоряющий химические реакции (2). На сегодняшний день самой информативной средой организма человека является кровь. Именно показатели системы крови дают полное представление о нарушениях в обменных процессах организма и состояния иммунного (антигенного) статуса (3).

Для раскрытия метаболических нарушений в организме необходим тщательный анализ клеточного ответа на действие внешних повреждающих факторов. При развитии патологии изменения затрагивают различные клеточные структуры, среди которых – «первую линию обороны» клетки занимает плазматическая мембрана. Современные методические подходы применяются для оценки как качества мембраны в целом, так и структурно-функционального статуса ее отдельных компонентов, которые используются как маркеры системных метаболических сдвигов. При проведении таких исследований наиболее удобным и доступным объектом служит эритроцит (4).

Эритроцит – универсальная модель для изучения процессов, происходящих в клеточной мембране под действием самых различных агентов. Его морфологическая перестройка приводит к изменениям мембранной проницаемости, кислотной резистентности и, в конечном счете, к разрушению (5). Детальное исследование изменений свойств эритроцитов под влиянием патогенных факторов, позволяет установить возможные последствия и определить наиболее эффективные пути их коррекции при различной патологии (6).

Целью данной работы стало исследование содержания гормона стресс-реакции – тироксина и кислотной резистентности эритроцитов крови при различных патологических состояниях. В соответствии с целью были поставлены следующие задачи: исследовать кислотную резистентность эритроцитов методом кислотных эритрограмм при опухоли матки, раке почки и диффузно-токсическом зобе; определить содержание общего тироксина в сыворотке крови людей с раком почки.

Для анализа структурных свойств эритроцитов применялся метод кислотных эритрограмм Терскова-Гительзона, определение кислотной резистентности эритроцитов позволяет точно определить устойчивость к гемолизу и возрастной состав красных клеток крови; для количественного определения общего тироксина в сыворотке крови использовался метод иммуноферментного анализа.

Материалом исследования являлась цельная кровь и сыворотка крови, взятой из локтевой вены натощак у пациентов с патологией: диффузно-токсический зоб (n=6), опухоль матки (n=24) и рак почки (n=24), в качестве контроля использовалась кровь здоровых людей (n=15).

Измерение кинетики гемолиза производится на фотоэлектрическом колориметре. В качестве гемолитика использовали соляную кислоту. Соблюдается температура 24 градуса по Цельсию. Мерой стойкости в этом методе служит время, прошедшее от введения кислоты до распада характеризуемой группы эритроцитов. Отсчет показаний прибора производят через каждые 30 секунд. Счет времени

начинается с момента введения кислоты. Результатом опыта является ряд значений оптической плотности, убывающей во времени в соответствии с ходом гемолиза (7).

Метод иммуноферментного анализа является современным методом лабораторного исследования крови на присутствие в ней антител к вирусам и антигенов к возбудителям болезни. Этот метод способен не только выявить этиологию, но еще и определить стадию заболевания. Результаты анализа имеют качественный и количественный показатель (8).

Основным фактором, определяющим стойкость эритроцита, является его возраст. Молодые эритроциты обладают наибольшей стойкостью и занимают на эритрограмме крайнее правое положение. У более зрелых эритроцитов снижается стойкость, что на эритрограмме отражается смещением влево. В норме эритрограмма здорового человека отражает динамическое равновесие в системе крови.

Процентное распределение эритроцитов по стойкости удобно изображать графической кривой - эритрограммой. Эритрограммы обнаруживают зависимость между стойкостью эритроцитов и их состоянием и позволяют характеризовать динамику качественного состава красной крови при физиологических и патологических процессах (7).

В результате были получены следующие данные: для крови лиц без патологии длительность гемолиза составляет 6,5 – 7,5 минуты, начало гемолиза на 2 минуте, конец гемолиза – на 7-7,5 минуте, резкий максимум наблюдается на 3,5 минуте (график 2). Показатели эритрограммы лиц без патологии соответствуют норме (график 1).

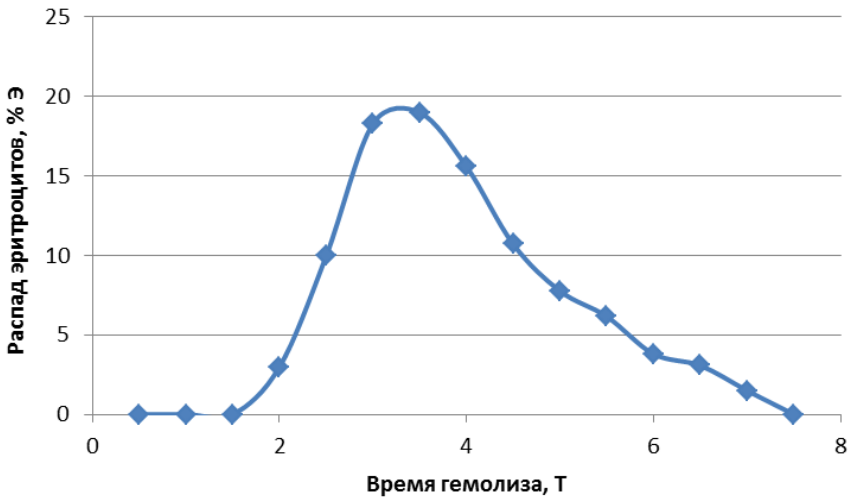

График 1 - Эритрограмма распределения эритроцитов по стойкости без патологии (норма)

Для крови пациентов с патологией «диффузно-токсический зоб» характерно начало гемолиза на 0,5 минуте, резкий максимум на 4 минуте и окончание гемолиза на 6,5 минуте. Эритрограмма пациентов с раком почки характеризуется началом гемолиза на 0,5 минуте, смещением максимума влево к 2,5 минуте и окончанием на 5,5 минуте. Эритрограмма пациентов с опухолью матки характеризуется началом гемолиза на 0,75 минуте, смещением максимума влево к 3,0 минуте и окончанием на 7,0 минуте (график 3). Иммуноферментный анализ показал, что концентрация общего тироксина Т4 у пациентов с раком почки не превышает норму при средних значениях равных 120,2 +. 7,2 и достоверности ≥ 95%.

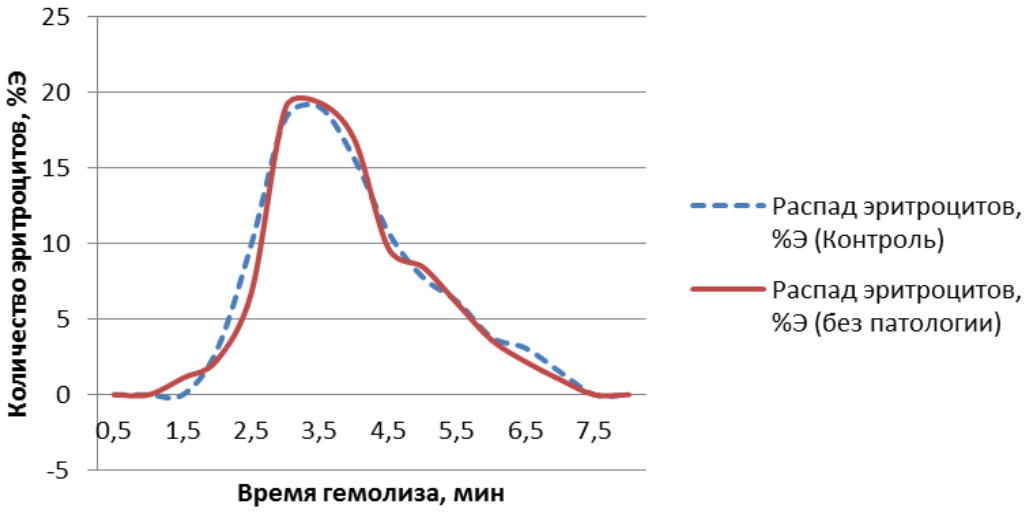

График 2 - Кислотная резистентность эритроцитов (Э) в норме и без патологии

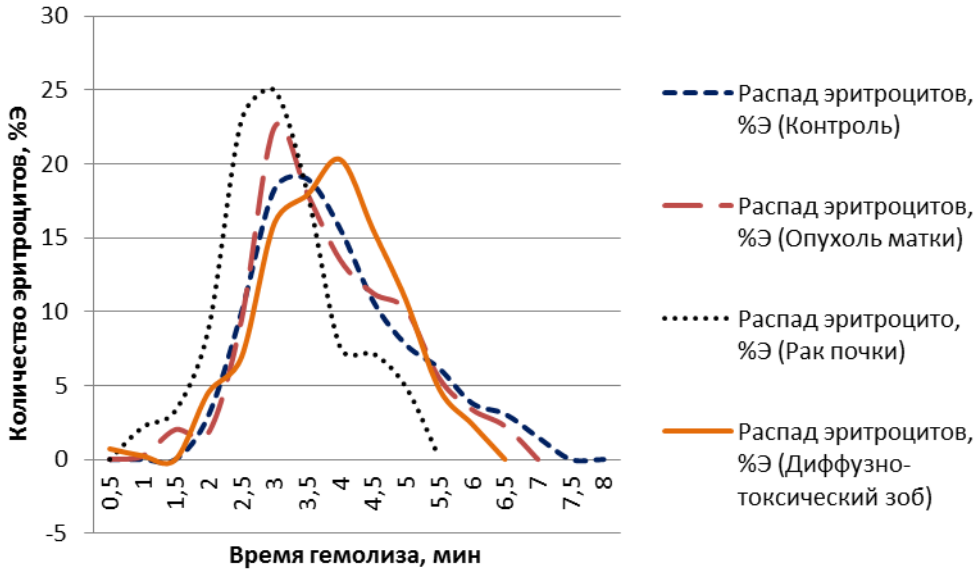

График 3 - Кислотная резистентность эритроцитов (Э) в норме, при опухоли матки, раке почки и диффузно-токсическом зобе

Раннее начало гемолиза указывает на усиление распада эритроцитов. Эритрограмма пациентов с раком почки и опухолью матки сдвинута влево, что связанно с преобладанием старых эритроцитов в системе крови и угнетение эритропоэза. Эритрограмма с диффузно-токсическим зобом имеет сдвиг вправо, который означает выброс в кровяное русло незрелых форм эритроцитов (7). Содержание общего тироксина Т4 соответствует норме, следовательно тироксин, как гормон стресс – реакций, вероятно, не вовлечен в механизм пагубного действия на мембрану эритроцитов при раке почке.

Список литературы

1. Л. К. Трофимова, И. А. Сурова, М. В. Маслова. Влияние однократного иммобилизационного стресса на метаболизм ГАМК // Нейрохимия. 2009.Т.26, №3.

2. В. М. Покровский, Г. Ф. Коротько. Физиология человека: Учебник. Москва : Медицина, 2007.

3. М. Б. Ингерлейб. Анализы. Полный справочник. Москва : Астрель, 2011.

4. А. Г. Камкин, И. С. Киселев. Физиология и молекулярная биология мембран клеток: Учебное пособие . М.: Академия : б.н., 2008.

5. Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quatannens B., Tissier J. P., et al. Programmed cell death in mature erythrocytes: A model for investigating death effector pathways operating in the absense of mitochondria. Cell Death Differ. 2008. 1143-56.

6. Р. Геннис. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. М. : Мир, 1997.

7. И. И. Гительзон, И. А. Терсков. Эритрограммы как метод клинического исследования крови. Красноярск : Сибирское отделение Академии Наук СССР, 1959.

8. Т. Т. Нго, Г. Ленхофф. Иммуноферментный анализ. М : Мир, 1988.

УДК616.155.392-036.12

УРОВЕНЬ АЛЛЕЛЬНОЙ НАГРУЗКИ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ КАЛЬРЕТИКУЛИНА У ПАЦИЕНТОВ С ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ТРОМБОЦИТЕМИЕЙ И ПЕРВИЧНЫМ МИЕЛОФИБРОЗОМ

Николаева П. А.
научные руководители А.С.Горбенко, канд. биол. наук, доц. Т.Н.Субботина
Сибирский федеральный университет
Красноярский филиал ФГБУ ГНЦ МЗ РФ

Диагностика хронических миелопролиферативных опухолей - эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза базируется на клинических симптомах и морфологии клеток крови и костного мозга. В последние годы все чаще используются молекулярно-генетические методы, позволяющие уточнить диагноз и прогноз течения болезни без необходимости пункции костного мозга. В конце 2013 года были обнаружены новые мутации в гене кальретикулина, связанные с развитием хронических миелопролиферативных опухолей, частота встречаемости мутаций при эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза составляет 68% и 82%, соответственно. В результате этих мутаций образуется изменённый участок кальретикулина, активирующий тромбопоэтиновый рецептор MPL и пролиферацию мегакариоцитов. Кальретикулин является многофункциональным кальций-связывающим белком эндоплазматического ретикулума. Кроме регуляции внутриклеточной концентрации кальция, этот белок принимает участие в формировании третичной структуры белка, обладая функцией шаперона. При его участии происходит образование полноценного антигенпрезентирующего макромолекулярного комплекса MHC1. Повышенная экспрессия кальретикулина сопряжена с успешной иммунной цитотоктической реакцией против опухолевых клеток и определяет благоприятный исход химиотерапии. Мутации c.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47) и c.1092_1143del (p.L367fs*46) в гене кальретикулина с 2014 г включены в рекомендации ВОЗ в качестве обязательного лабораторного теста для подтверждения диагноза. Вместе с тем, в литературе пока нет данных о диагностическом значении уровня аллельной нагрузки мутантного аллеля отражающего пул циркулирующих клональных клеток

Целью настоящего исследования явилась разработка способа определения уровня аллельной нагрузки мутаций в гене кальретикулина в пробах периферической крови у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом.

Объектом исследования явилась ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом. Наличие мутаций в гене кальретикулина определяли методом аллель-специфической ПЦР в реальном времени. В дальнейшем уровень аллельной нагрузки рассчитывали по формуле:

аллельная нагрузка=$2^{(Ct_{общ}-Ct_{мут})}*100\%$

где $Ct_{мут}$ – пороговый цикл выхода мутантного аллеля, $Ct_{общ}$ – пороговый цикл выхода гена кальретикулина. Статистическую обработку данных проводили в программе «Statistica 6.0».

Для определения уровня аллельной нагрузки мутаций в гене кальретикулина с эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом было взято 55 проб, среди которых 35 проб имели мутацию c.1092_1143del, и 20 проб - мутацию c.1155_1156insTGTCG. Частота встречаемости уровней аллельной нагрузки у

пациентов с хроническими миелопролиферативными опухолями представлена в виде диаграммы.

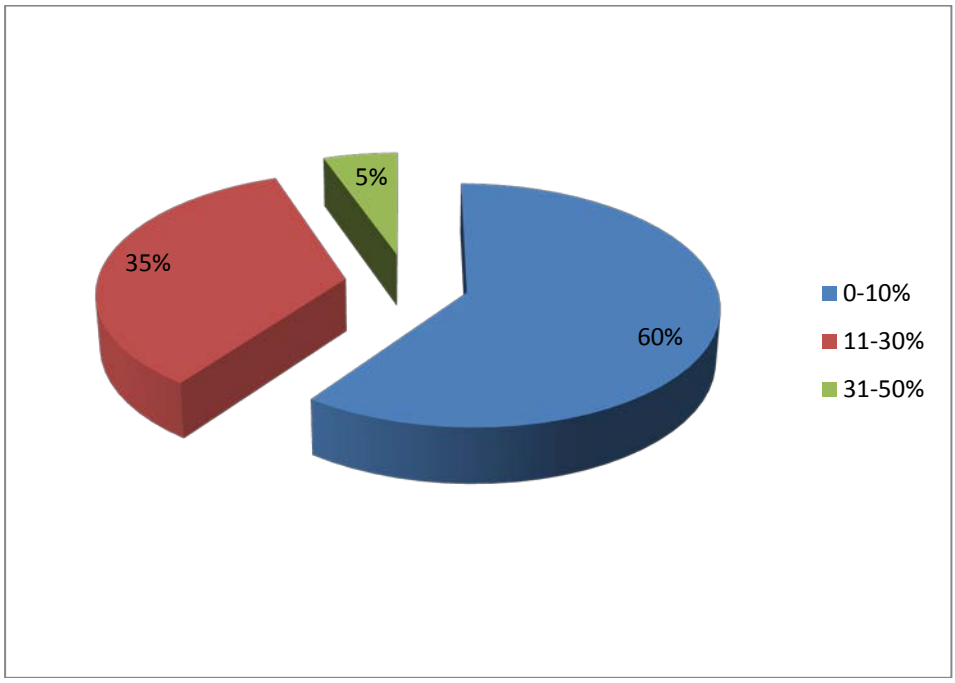

Рис. 1 - Частота встречаемости уровней аллельной нагрузки при хронических миелопролиферативных опухолях

Уровень аллельной нагрузки изменяется в пределах от 0,2% до 50% (у 60% проб в пределах от 0,2% до 10%).

Отличия между несвязанными выборками оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для определения корреляции между количественными характеристиками пользовались методом корреляции по Спирману. Отличия считали статистически значимыми при значениях p-уровня $< 0,05$.

Корреляционной связи между аллельной нагрузкой и форменными элементами крови не обнаружено. При мутации c.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47) и первичном миелофиброзе уровень аллельной нагрузки выше, чем при мутации c.1092_1143del (p.L367fs*46) и эссенциальной тромбоцитемии соответственно (p-уровень $< 0,05$).

Таким образом, нами показана возможность количественной оценки уровня аллельной нагрузки мутантного аллеля в гене кальретикулина. Вероятная связь аллельной нагрузки с особенностями клинической картины эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза, а также с прогнозом течения заболевания является предметом дальнейших исследований.

Список литературы

1. Моисеев С. И. Хронические миелопролиферативные заболевания. Классификация, диагностика и лечение : пособие для студентов / С. И. Моисеев, А. Ю. Зарицкий, Г. Н. Салогуб. - Санкт-Петербург, 2005. - 41 с.
2. Gold L. I. Calreticulin: non-endoplasmic reticlum functions in physiology and disease / L. I. Gold, P. Eggleton, M. T. Sweetwyne. - 2010
3. Tefferi A. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact / A. Tefferi, T. L. Lasho, C. M. Finke. - 2014
4. Rumi E. JAK 2 or CALR mutation status defines subtypes of essential trombocythemia with substantially different clinical cource and outcomes / E. Rumi, D. Pietra, V. Ferretti. - 2013

УДК 57.041

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ РАЗНЫХ ВИДАХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

Рожнова М.В., Шилкина А.С.
научный руководитель канд. биол. наук Гершкорон Ф. А.
Сибирский федеральный университет

Одной из важнейших реакций организма, обеспечивающих жизнедеятельность организма, является воспаление. Воспаление – это целесообразная и благоприятная реакция организма на повреждение и инфицирование, т.е. это реакция организма на воздействия, нарушающие гомеостаз. Воспалительная реакция направлена на восстановление исходного состояния организма.[1] Комплекс местных и системных изменений, возникающих непосредственно вслед за повреждением, направленный на восстановление функций в совокупности составляет понятие острой фазы воспаления.[2]

Биологический смысл воспаления как эволюционно сложившегося процесса заключается в отграничении и ликвидации очага повреждения и вызвавших его патогенных факторов.[5] Воспалительной реакцией организм отвечает как на экзогенные, так и на эндогенные патологические раздражители.

Важнейший аспект острой фазы – повышенная продукция печенью белков острой фазы воспаления (α$_1$-антитрипсин, орозомукоид, церулоплазмин, С-реактивный белок, гаптоглобин и др.). Увеличение концентрации белков острой фазы в крови является хорошим индикатором не только явного, но и скрытого воспаления.[3]

Острая фаза воспаления - комплекс местных и системных изменений, возникающих непосредственно вслед за повреждением. Острая фаза характеризуется повышением температуры, изменением проницаемости сосудов, изменением биосинтетических и метаболических процессов многих органов.[4,8] Ответ острой фазы – общие не специфические реакции на повреждение, которые вовлекают в ответ важнейшие защитные и регуляторные системы организма и типовые изменения обмена веществ. Уровень белков острой фазы в несколько сотен раз повышается при наличии любого повреждения тканей, вызванного вирусами, бактериями, антителами, некрозом.[6]

Белки являются наиболее важными и сложными органическими соединениями, входящими в состав живых организмов. Не только каждый вид живого, но и каждый орган, каждый тип клеток обладает своим специфическим набором белков.

В количественном соотношении они занимают первое место среди всех содержащихся в живой клетке макромолекул. Так, в организме человека белки составляют 40-50% из расчета на сухую массу.[7]

Целью работы было исследовать содержание белков острой фазы воспаления в крови людей при разных видах патологических состояний.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать содержание С-реактивного белка методом латекс-агглютинации в сыворотке крови людей при разных видах патологических состояний;
2. Исследовать содержание церулоплазмина по методу Равина в плазме крови людей при разных видах патологических состояний.

Объектом исследований являлась плазма 11 и сыворотка 13 больных людей. Контрольную группу составили 18 здоровых людей.

Уровень церулоплазмина определяли в плазме крови по методу Равина. Принцип метода основан на окислении р-фенилендиамина при участии

церулоплазмина. По оптической плотности окрашенного раствора судят о концентрации церулоплазмина.

Для определения С-реактивного белка в сыворотке крови был использован метод латекс теста. Латекс реагент представляет собой суспензию латексных частиц, на поверхности которых иммобилизованы антитела против С-реактивного белка человека. При смешивании данного реагента с сывороткой крови, содержащей С-реактивный белок, происходит специфическая реакция между антителами и С - реактивным белком. В результате реакции развивается агглютинация латексных частиц. Агглютинация определяется визуально, что свидетельствует о положительной реакции пробы.

Были определены уровни церулоплазмина у 18 здоровых людей, 9 с ишемической болезнью сердца и 3 больных раком почек.

Согласно литературным данным, нормальное содержание церулоплазмина в крови людей составляет: мужчины – 160-450 мг/л; женщины – 150-600 мг/л. В ходе исследования было выявлено, что средние значения по группам укладываются в нормальные значения по данным литературы: женщины – 396,6±31,7 мг/л; мужчины – 310,2±44,9 мг/л. Представленные результаты средних значений концентрации церулоплазмина в плазме крови здоровых мужчин и женщин укладываются в нормальные значения по литературным данным. Содержание С-реактивного белка в контрольной группе соответствует норме. Это подтверждает, что воспалительные процессы в крови людей контрольной группы отсутствуют.

Результаты исследования также показали, что у людей с ишемической болезнью сердца и раком почки содержание церулоплазмина в плазме крови выше, чем в контрольной группе: среднее значение при ишемической болезни сердца составило 450.58±21.405, среднее значение при раке почки – 515.42±52,48 и среднее значение контроля – 362.34±11.9; разница между контролем и опытными образцами при ишемической болезни сердца и раке почки оказалась статистически достоверной (P=0.01).

С-реактивный белок был определен у 11 больных раком почек и у 2 больных с распространенным гнойным перитонитом. Результаты показывают колебание содержания СРБ при раке почек в интервале 6< С<18, при распространенном гнойном перитоните – 6<С<42, из это можно сделать вывод, что у больных содержание СРБ в сыворотке крови повышается по сравнению с нормальными значениями до 6 мг/л.

***

Проведенные исследования показали повышение уровня церулоплазмина у людей с ишемической болезнью сердца и больных раком почки по сравнению с контрольной группой. Наблюдается увеличение уровня С-реактивного белка у людей больных раком почки и людей с распространенным гнойным перитонитом. Полученные результаты свидетельствуют о протекании воспалительных процессов в организме больных.

Список литературы

1. Морозова В.Т. Значение общеклинических исследований в диагностике заболеваний / В.Т. Морозова, Р.Л. Марцишевская, И.И. Миронова и др. // Клин. лаб. диагностика. – 1995. – № 6. – С. 101-104.

2. Клинико-диагностическое значение лабораторных показателей / В. Долгов [и др.]. – Москва, 1995.

3. Дайбанырова, Л.В. Клиническое значение С-реактивного белка и церулоплазмина у больных ишемической болезнью сердца: автореф. дис. канд. мед. наук.: 14.00.06. / Л.В. Дайбанырова. – Москва, 2007. - 23 с.

4. Назаров, П.Г. Белки острой фазы воспаления / П.Г. Назаров.-Санкт-Петербург, 2001.-С.41-45.
5. Пауков В.С. Роль нейтрофилов и макрофагов в локализации гноеродной инфекции / В.С. Пауков // Архив патологии. – 1986. – № 3. – С. 30-38.
6. Полотнянко Л.И. Клиническая химия: [учеб. пособие] / Л.И. Полотнянко. – Москва: ВЛАДОС-ПРЕСС, 2008. – 343 с. : ил. – (Учебник для студентов медицинских училищ).
7. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия: учебник / Ю.А. Овчинников – 1987.
8. Abernathy, T.J. The occurrence during acute infection of a protein not normally present in the blood. I. Distribution of the reactive protein in patient's sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C-polysaccharide of pneumococcus / T.J. Abernathy, O.T. Avery // J. Exp. Med. – 1991. - Vol. 73. – P. 173–181.

УДК 612.017.1:616.33-02.27

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ АТРОФИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ.

Синяков А.А., Коляда Е.А.
научные руководители д-р мед. наук Смирнова О.В., д-р мед. наук Цуканов В.В.
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера

Хронический гастрит (ХГ) - длительно текущее рецидивирующее заболевание с воспалительным поражением слизистой оболочки желудка[1]. Хроническим гастритом страдает 50-80% взрослого населения Российской Федерации[2]. Согласно каскаду Корреа хронический гастрит в 40 % случаев перерождается в хронический атрофический гастрит (ХАГ), который относится к предраковым состояниям[3].

При хроническом атрофическом гастрите наблюдается истончение слизистой оболочки с уменьшением желез и развитием секреторной недостаточности желудка[4]. При атрофическом гастрите, ассоциированным с H. Pylori, происходят выраженные иммунные нарушения. [5].

Кульминацией патологического процесса в желудке является развитие рака. Таким образом, слизистая оболочка желудка изменяется от хронического гастрита, через хронический атрофический гастрит, к раку желудка. Не исключается роль иммунной системы в прогрессировании патологического процесса.

В связи с этим целью нашей работы было изучение концентрации ФНО-альфа, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-4 и Интерферон-гамма у больных хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом.

Материалы и методы

Обследовано 100 больных с хроническим гастритом, из них у 25 выявлен хронический атрофический гастрит, в возрасте от 25 до 65 лет. Больные с хроническим гастритом поступили в гастроэнтерологическое отделение НИИ медицинских проблем Севера, в 2013-2015 годах. Контрольную группу составили 100 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой.

Концентрация ФНО-альфа, ИЛ-2, ИЛ-8 ИЛ-4 и Интерферон-гамма в плазме крови у больных хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом определялась с помощью метода иммуноферментного анализа (набор ОАО «Витал Девелопмент Корпорейшн») [6;7;8].

Материалом для исследования являлась кровь (10 мл) из локтевой вены, которая забиралась утром натощак, в вакутейнеры с добавлением раствора гепарина натрия (5 ЕД/мл). Оценка иммунитета изучалась при поступлении больных в стационар до начала патогенетической терапии.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, USA). Анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения проводился с использованием критерия Шапиро – Уилка. При описании выборки вычислялись медианы(Me) и интерквартильный размах процентилей (C_{25} - C_{75}). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по критерию Манна – Уитни ($p<0.05$).

Результаты исследования и обсуждение

Интерлейкины осуществляют главную роль в реализации иммунного ответа[9]. Цитокины являются регуляторами основных этапов жизнедеятельности любой клетки организма, модулируя процессы пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза[10]. ИЛ-2 провоспалительный цитокин, продуцируется Т-хелперами 1 типа (Th1). Повышение ИЛ-2 выявляется у больных с преобладанием эрозивно-язвенных изменений слизистой оболочки желудка. ИЛ-4 противовоспалительный цитокин, продуцируется Т-хелперами 2 типа (Th2). ИЛ-4 является основным фактором в определении дифференцировки стимулированных антигеном наивных CD4+ - клеток[11]. ИЛ-8 идентифицируется как маркер «адаптивного иммунитета» на персистенцию H. Pylori в организме[12]. Цитокин является медиатором Th1-пути иммунного ответа, фактором дифференцировки и рекрутирования клеток-эффекторов воспаления[12]. ИФН-γ провоспалительный и регуляторный цитокин является одним из факторов дифференцировки В-клеток. ИФН-γ усиливает противоопухолевое действие цитотоксических лимфоцитов. ФНО–альфа, провоспалительный цитокин, в основном продуцируется моноцитами и макрофагами. Может оказывать цитотоксический эффект на организм.

У больных хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом происходит повышение интерлейкина- 2 (p_{1-2}<0,001; p_{1-3}<0,001), интерлейкина- 4 (p_{1-2} <0,001; p_{1-3}<0,001), интерлейкина- 8 (p_{1-2}<0,001; p_{1-3}<0,001) и интерферон-гамма (p_{1-2} <0,001; p_{1-3}<0,001) по сравнению с контрольной группой. Не было достоверных различий в содержании провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у больных хроническим гастритом и больных хроническим атрофическим гастритом. Содержание ФНО-альфа достоверно не изменялось у больных хроническим гастритом по сравнению с контрольной группой. Данные указаны в таблице 1.

Таблица 1 – Содержание цитокинов у больных хроническим гастритом (ХГ) и хроническим атрофическим гастритом (ХАГ) в сравнении с контрольной группой (Me, C_{25}-C_{75}, p_{m-u})

Показатели	Контроль, N=100 (1)		Больные ХГ, N=85 (2)		Больные ХАГ, N=25 (3)	
	Me	C_{25}-C_{75}	Me	C_{25}-C_{75}	Me	C_{25}-C_{75}
ФНО-альфа (пг/мл)	0,54	0,38-0,87	0,67	0,44-0,93	0,78	0,56-1,3
ИЛ-2 (пг/мл)	1,1	0,5-3,05	5,7	3,6-10,3	4,9	3,8-9,5
			p_{1-2}<0,001		p_{1-3}<0,001	
ИЛ-8 (пг/мл)	2,1	0,5-4,0	40,5	7,5-97,2	38,1	5,5-87,3
			p_{1-2}<0,001		p_{1-3}<0,001	
ИЛ-4(пг/мл)	7,0	5,6-7,8	86,8	76,8-103,5	91,4	73,2-112,3
			p_{1-2}<0,001		p_{1-3}<0,001	
Интерферон-гамма (пг/мл)	0,6	0,22-4,0	2,9	2,2-4,0	3,2	2,3-4,8
			p_{1-2}< 0,001		p_{1-3}<0,001	

Примечание: p_{1-2} –достоверные различия между группой больных ХГ и контрольной группой.

p_{1-3} - достоверные различия между группой больных ХАГ и контрольной группой.

p_{2-3} - достоверные различия между группой больных ХГ и группой больных ХАГ.

Заключение

У больных страдающих хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом происходит значительное повышение уровня концентрации провоспалительных цитокинов. Это связано с интенсивным воспалительным процессом протекающим в слизистой оболочке желудка. Увеличение концентрации ИЛ-2, ИЛ-8, IFNγ способствует реализации воспалительного и атрофического процессов в слизистой оболочке желудка с постепенным компенсаторным включением цитопротективных и репаративных механизмов. Количество противовоспалительного цитокина ИЛ-4 нарастает при прогрессировании атрофии, ограничивая действие провоспалительных цитокинов и усиливая репарацию слизистой оболочки желудка. Отсутствие изменений в содержании провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у больных хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом свидетельствует об идентичности воспалительного процесса, обусловленного H. Pylori.

Список литературы

1. Хронический гастрит / Л.И.Аруин [и др.]. – Амстердам, 1993. – 362 с.
2. Цуканов В.В., Третьякова О.В., Амельчугова О.С., Каспаров Э.В.и др. Распространенность атрофического гастрита тела желудка у населения г. Красноярска старше 45 лет // Рос.журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2012. №4. С.27-31.
3. Correa P. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis // Am. J. Surg. Pathol. 1995. Vol. 19. N 1. P. 37-43.
4. Спасова Т.Е. Особенности течения язвенной болезни желудка на фоне хронического атрофического гастрита (по данным гастрологического отделения РКБ им. Семашко) / Т.Е. Спасова // Вестник Бурятского государственного университета, №12, Бурятский государственный университет (Улан – Удэ), 2010, С. 179-182.
5. Тактика ведения пациентов с предраковыми изменениями в желудке / В.В. Цуканов [и др.] // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2013. №3. С. 4-8.
6. Агилова Ю.Н., Смирнова О.В., Манчук В.Т. Роль цитокинов в прогрессировании миеломной болезни // Врач-аспирант. 2014. № 1.3.Т 62. С. 404-407.
7. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Поливанова Т.В., Агилова Ю.Н. Особенности цитокиновой регуляции при прогрессировании множественной миеломы // Медицинская иммунология. 2015. № 3. Т 17. С. 261-268.
8. Смирнова О.В., Титова Н.М., Манчук В.Т., Елманова Н.Г. Особенности цитокиновой регуляции у больных механической желтухой различного генеза // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 4. С. 425.
9. Кетлинский, С. А. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. – СПб: Фолиант, 2008 – 552 с.
10. Царегородцева, Т. М. Цитокины в гастроэнтерологии / Т. М. Царегородцева, Т. И. Серова. М.: Анархис, 2003. - 96 с.
11. Агеева Е.С. Эффекты цитокинов в патогенезе Helicobacter pylori-ассоциированных хронического гастрита и язвенной болезни / Е.С. Агеева // Сибирский медицинский журнал № 2. - Абакан, 2014. – С. 5-8.
12. Rieder G., Einsiedl W., Hatz R.A., et al. Comparison of CXC chemokines ENA-78 and interleukin-8 expression in Helicobacter pylori-associated gastritis // Infection and Immunity. – 2001. – Vol. 69. – P.81-88.

УДК 612. 017 . 1 : 616. 33 – 02. 27

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА В КРОВИ У БОЛЬНЫХ АТРОФИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ И РАКОМ ЖЕЛУДКА

Синяков А.А.
научные руководители д-р мед. наук Смирнова О.В.,
д-р мед. наук Цуканов В.В.
Научно-исследовательский институт медицинских проблем севера

В соответствии с концепцией патогенеза рака желудка предраковой патологией является атрофический гастрит, который ассоциирован с возникновением и прогрессированием метаплазии, дисплазии и, в конечном итоге, рака желудка [2]. Проблема рака желудка остается недостаточно решенной во всем мире [3]. Наиболее очевидным путем снижения заболеваемости раком желудка является оптимизация диагностики, лечения и профилактики гастрита [4]. В 2015 г. группа международных экспертов создала новый международный консенсус по ведению пациентов с гастритом, основные положения которого верифицируют идею патогенетической связи атрофического гастрита и рака желудка, подчеркивают роль серологической диагностики гастрита и определяют перспективы профилактики онкологической патологии [5].

Важным аспектом является изучение изменений иммунного статуса при онкологических заболеваниях [6]. Предполагается, что опухоль способна индуцировать иммуносупрессию, что может приводить к неэффективности противоопухолевой иммунотерапии [7]. Однако работ по данному вопросу недостаточно. Литературные сведения о состоянии клеточного иммунитета при хроническом гастрите имеют противоречивый характер [8]. В связи с этим целью нашей работы было изучение особенностей клеточного звена иммунитета у больных хроническим неатрофическим и атрофическим гастритами и раком желудка.

Материалы и методы

Обследовано 85 больных с хроническим гастритом (ХГ), 25 пациентов с хроническим атрофическим гастритом (ХАГ), 50 больных раком желудка (РЖ) и 90 практически здоровых лиц в возрасте от 25 до 65 лет. Больные с хроническим гастритом находились в гастроэнтерологическом отделении НИИ медицинских проблем Севера, 50 пациентов с раком желудка проходили лечение на базе КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского» в 2013-2015 годах.

Всем обследованным пациентам утром натощак забиралась кровь (10 мл) из локтевой вены в пробирки Vacutainer с раствором гепарина натрия (5 ЕД/ мл).

Серологическая диагностика атрофического гастрита проведена с помощью определения пепсиногенов в сыворотке крови. В сыворотке крови определялись пепсиноген-1, пепсиноген-2 и антитела к Helicobacter pylori с помощью иммуноферментного анализа на ИФА-анализаторе «СтатФакс-3000», используя тест-систему «Гастропанель» («Биохит», Финляндия). Маркером выраженной атрофии слизистой оболочки тела желудка мы считали уровень пепсиногена-1 менее 25 мкг/л и значение отношения пепсиноген-1/пепсиноген-2 меньше 3; показатели концентрации пепсиногена-1 от 25 до 50 мкг/л – относили к слабо и средне выраженной атрофии тела желудка, нормальным уровнем пепсиногена-1 считали концентрацию более 50 мкг/л в сыворотке крови. Титры антител к H. pylori от 30 EIU и более считали положительным результатом, менее 30 EIU - отрицательным результатом определения H. pylori.

Оценка иммунитета изучалась при поступлении больных в стационар до начала патогенетической терапии. Оценка клеточного звена иммунитета проводилась методом непрямой иммунофлюоресценции с участием моноклональных антител (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD95, HLA-DR. Сорбент, Москва) [1]. Иммунофлуоресцентный анализ выполнялся вручную при помощи флюоресцентного микроскопа.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, USA). Анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения проводился с использованием критерия Шапиро - Уилка. При описании выборки вычислялись медианы (Me) и интерквартильный размах процентилей (C_{25} -C_{75}). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по критерию Манна - Уитни ($p<0.05$).

Результаты исследования и обсуждение

Частота инфекции H. Pylori не имела существенных отличий в обследованных группах и составила 77,8% в группе контроля, 82,3%у больных ХГ (p=0,45), 88,0% у лиц сХАГ(p=0,26) и 86% у пациентов с РЖ(p=0,24).

У больных РЖ статистически значимо увеличилось абсолютное количество лейкоцитов (11,64 на 10^9/л) и лимфоцитов (5,0 на 10^9/л) в сравнение со всеми исследуемыми группами (p<0,001).

Количество $CD3^+$- и $CD4^+$-клеток у больных РЖ снижалась в сравнении со здоровыми лицами, что явилось проявлением выраженного вторичного иммунодефицита. Аналогичная закономерность наблюдалась при сопоставлении больных ХАГ с контрольной группой (табл. 1). Абсолютное количество $CD3^+$- и $CD4^+$-клеток у больных РЖ не было столь же низким, как их относительное содержание (табл. 1). Лейкоцитоз и лимфоцитоз у больных раком желудка позволяет в некоторой степени компенсировать резкие изменения в соотношении фракций лимфоцитов. Относительное содержание $CD8^+$- и $CD16^+$- клеток снижалось у больных РЖ в сравнении с контрольной группой. Но за счет лейкоцитоза и лимфоцитоза, абсолютное содержание $CD8^+$- и $CD16^+$-клеток было сравнительно высоким (табл. 2). У больных атрофическим гастритом абсолютное количество $CD8^+$- и $CD16^+$-клеток было более низким, чем в контрольной группе (табл. 2). При исследовании $CD19^+$-клеток абсолютное количество В – лимфоцитов увеличивалось в группе больных РЖ по сравнению с остальными исследуемыми группами (РЖ - 0,5 на 10^9/л; ХАГ – 0,2 на 10^9/л; ХГ – 0,23 на 10^9/л; контроль - 0,29 на 10^9/л).

Заключение

У больных атрофическим гастритом и раком желудка в сравнении с контрольной группой выявлялось снижение абсолютного содержания Т-лимфоцитов и CD4+-клеток, что свидетельствует о вторичном Т-клеточном иммунодефиците. Выявленные закономерности могут иметь значение для определения пациентов с повышенным риском прогрессирования атрофического гастрита.

Таблица 1 - Содержание $CD3^+$и $CD4^+$-клетокв плазме крови у больных гастритом и раком желудка

Показатели	$CD3^+$, (%)		CD3+, (10^9/л)		$CD4^+$, (%)		$CD4^+$, (10^9/л)	
	Me	C_{25}-C_{75}	Me	C_{25}-C_{75}	Me	C_{25}-C_{75}	Me	C_{25}-C_{75}
1.Контроль, n=100	66,0	60,0-72,0	1,43	0,93-2,41	45,0	34,0-48,75	0,97	0,52-1,63
2. ХГ,n=85	28,0	21,0-34,0	0,58	0,21-0,59	30,0	25,0-34,0	0,68	0,63-0,77

3. ХАГ,n=25	31,0	28,0-40,0	0,40	0,54-0,82	30,0	20,0-36,0	0,39	0,25-0,56
4. РЖ,n=50	16,0	13,0-23,0	0,8	0,5-1,67	12,0	9,0-18,0	0,6	0,34-1,3
P	P_{1-2}<0,001 P_{1-3}<0,001 P_{1-4}<0,001 P_{2-3}=0,097 P_{2-4}<0,001 P_{3-4}=0,022		P_{1-2}<0,001 P_{1-3}<0,001 P_{1-4}<0,001 P_{2-3}=0,2 P_{2-4}=0,045 P_{3-4}=0,55		P_{1-2}<0,001 P_{1-3}<0,001 P_{1-4}<0,001 P_{2-3}=0,9 P_{2-4}<0,001 P_{3-4}=0,014		P_{1-2}<0,001 P_{1-3}=0,002 P_{1-4}=0,12 P_{2-3}=0,02 P_{2-4}=0,78 P_{3-4}=0,06	

Примечание: достоверность различий показателей вычислена при помощи критерия Манна – Уитни.

Таблица 2 - Содержание $CD8^+$и $CD16^+$-клеток в плазме крови у больных гастритом и раком желудка

Показатели	CD8+, (%)		CD8+, (10^9/л)		CD16+, (%)		CD16+, (10^9/л)	
	Me	C25-C75	Me	C25-C75	Me	C25-C75	Me	C25-C75
1. Контроль, n=100	27,0	20,0-33,75	0,58	0,31-1,13	20,0	17,0-23,0	0,43	0,26-0,77
2. ХГ, n=85	28,0	21,0-32,0	0,47	0,35-0,56	24,0	16,0-26,0	0,41	0,24-0,48
3. ХАГ, n=25	24,0	16,0-36,0	0,46	0,41-0,75	19,0	8,0-26,0	0,24	0,1-1,0
4. РЖ, n=50	13,0	10,0-22,0	0,65	0,54-0,73	14,0	5,0-19,0	0,7	0,19-1.38
P	P_{1-2}=0,37 P_{1-3}=0,4 P_{1-4}<0,001 P_{2-3}=0,02 P_{2-4}<0,001 P_{3-4}=0,011		P_{1-2}=0,01; P_{1-3}=0,04 P_{1-4}=0,6 P_{2-3}=0,12 P_{2-4}=0,05 P_{3-4}=0,067		P_{1-2}=0,01 P_{1-3}=0,8 P_{1-4}<0,001 P_{2-3}=0,23 P_{2-4}<0,001 P_{3-4}=0,014		P_{1-2}=0,39 P_{1-3}=0,03 P_{1-4}=0,06 P_{2-3}=0,08 P_{2-4}=0,043 P_{3-4}=0,02	

Примечание: достоверность различий показателей вычислена при помощи критерия Манна – Уитни.

Список литературы

1. Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N., Berliner E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody // J. Immunol. 1942. Vol. 45. P. 159-170.
2. Correa P. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis // Am. J. Surg. Pathol. 1995. Vol. 19. N 1. P. 37-43.
3. Graham D.Y. Helicobacter pylori update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits // Gastroenterology. 2015. Vol. 148. N 4. P. 719-731.
4. Tsukanov V.V., Butorin N.N., Maady A.S., Shtygasheva O.V. et al. Helicobacter pylori Infection, Intestinal Metaplasia, and Gastric Cancer Risk in Eastern Siberia // Helicobacter. 2011. Vol. 16. N 2. P. 107-112.
5. Sugano K., Tack J., Kuipers E.J., Graham D.Y. et al. Kyoto global consensus report on Helicobacter pylori gastritis // Gut. 2015. Vol. 64. N 9. P. 1353-1367.
6. Giraldo N.A., Becht E., Vano Y., Sautes-Fridman C. The immune response in cancer: from immunology to pathology to immunotherapy // Virchows Arch. 2015. Vol. 467. N 2. P. 127-135.
7. Siska P.J., Rathmell J.C. T cell metabolic fitness in antitumor immunity // Trends Immunol. 2015. Vol. 36. N 4. P.257-264.
8. Щербак В.А. Состояние иммунитета у детей с хроническим гастродуоденитом // Вопросы практической педиатрии. 2014. № 2. С. 20–24.

УДК 616.155.05

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОРНК MIR-155 В ПРОБАХ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С МИЕЛОИДНЫМИ ОПУХОЛЯМИ

Столяр М.А.
научные руководители д-р мед. наук Гительзон И.И., канд. мед. наук Ольховский И.А.
Сибирский федеральный университет
Красноярский филиал гематологического научного центра МЗ РФ

Хронические миелоидные опухоли (ХМО) представляют собой группу клональных заболеваний, возникающих вследствие мутаций в гемопоэтической стволовой клетке, среди которых различают три нозологические формы: истинную полицитемию (ИП), эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ) и первичный миелофиброз (ПМФ), диагностическим маркером которых являются соматические мутации в гене янус-киназы 2 (JAK2), гене рецептора тромбопоэтина (MPL) и в гене кальретикулина (CALR) [1]. Однако известно, что при ХМО в 20-30% случаев не выявляются мутации в этих генах, в связи с чем бывает весьма сложно провести дифференциальную диагностику имеющимися лабораторными методами анализа; также известно, что у 25% пациентов с ХМО происходит трансформация основного заболевания в фазу бластного криза, являющегося в большинстве случаев терминальным состоянием [2]. К перспективным маркерам, отражающим особенности патохимии опухолевого процесса, относятся некодирующие микроРНК.

МикроРНК представляют собой короткие (длиной 19-24 нуклеотида), не кодирующие белки РНК, принимающие участие в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов через репрессию специфических целевых мРНК. МикроРНК играют важную роль в качестве биомаркеров множества заболеваний и являются мощным инструментом для понимания механизмов регуляции экспрессии генов. Известно, что микроРНК циркулируют в периферической крови в виде стабильных внеклеточных молекул и могут служить биомаркерами различных заболеваний, в том числе опухолевых [3]. Показана важная роль микроРНК miR-155 в регуляции иммунного процесса, пролиферации и дифференцировки клеток в ходе кроветворения [4], установлена связь miR-155 с патогенезом миелоидных неоплазий и, в частности, с развитием миелофиброза [5]. Однако на сегодняшний день отсутствуют методы клинической лабораторной диагностики, основанные на измерении уровня микроРНК, приемлемые для оценки их диагностической значимости при развитии ХМО.

Цель работы: разработка метода измерения уровня циркулирующей микроРНК miR-155 оценка её диагностического значения при хронических миелоидных опухолях.

Материалы и методы

В настоящее исследование включены данные обследования 51 пациента с диагнозом ХМО, в том числе: 34 с ИП, 9 с МФ, 6 пациентов с ЭТ, а также 8 здоровых добровольцев включены в группу контроля. Количественный анализ микроРНК miR-155 проводили в тромбоцитах, выделенных методом двухэтапного центрифугирования цельной крови: на первом этапе получали обогащенную тромбоцитами плазму при 150 g в течение 5 мин, затем надосадочную жидкость центрифугировали при 0,1 g в течение 5 мин для удаления лейкоцитов, после чего надосадочную жидкость центрифугировали при 13 000 g в течение 5 мин, осадок клеток замораживали при -70ºС.

Выделение микроРНК из тромбоцитов проводили методом, разработанным в ИХБФМ СО РАН, лаб. Фармакогеномики (зав. к.б.н. Филипенко М.Л.) с использованием фенол-хлороформной экстракции. Для нормализации результатов использовали синтетическую микроРНК Caenorhabditis elegans (cel-miR-39).

Обратную транскрипцию исследуемых микроРНК проводили с помощью набора для обратной транскрипции («Синтол») и оригинального длинного праймера со шпилькой, специфического к каждой микроРНК.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени проводили на приборе iCycler iQ5 (“Bio-Rad”) с помощью оригинальных прямого и обратного праймеров, комплементарных соответствующим последовательностям кДНК, детекция результата проводилась с использованием TaqMan зондов, специфических к каждой микроРНК. Относительное содержание miR-155 в образцах вычисляли по методу ΔC_t:

$$\frac{E(miR155)^{-(CtmiR155)}}{E(ref)^{-(Ctref)}}$$, где

E – эффективность ПЦР, Ct_{miR155} – пороговый цикл для исследуемой микроРНК, Ctref – пороговый цикля для микроРНК, используемой для нормализации.

Оценку эффективности ПЦР для miR-155 и cel-miR-39 проводили с использованием их синтетических стандартов.

Результаты и обсуждение

В процессе отработки метода, была проведена оптимизация условий проведения ПЦР, достигнута приемлемая для количественного анализа эффективность реакции: для miR-155 эффективность ПЦР составила 102%, для cel-miR-39 - 88%. МикроРНК cel-miR-39, добавленная в пробы для нормализации результатов, присутствовала в каждом исследуемом образце, среднее значение порогового цикла составило 24,8, при этом коэффициент вариации Ct между пробами составил 3%, что свидетельствует о минимальных потерях микроРНК в ходе выделения РНК и хорошей воспроизводимости методики выделения РНК.

Продемонстрировано, что в пробах плазмы крови наших пациентов с ХМО и здоровых доноров свободно циркулирующая miR-155 отсутствует, что соответствует данным, известным для здоровых пациентов.

При анализе микроРНК в исследуемых плазмах крови пациентов с ХМО и здоровых доноров циркулирующей miR-155 обнаружено не было.

Как видно из графика, уровень экспрессии микроРНК miR-155 был достаточно гетерогенным в тромбоцитах крови разных групп. Следует отметить, что среди пациентов с мутацией в гене JAK2 чаще, чем в других группах, наблюдались повышенные значения экспрессии miR-155. Продолжение данного исследования позволит впервые определить диагностическое значение количественного определения miR-155 в тромбоцитах периферической крови при ХМО.

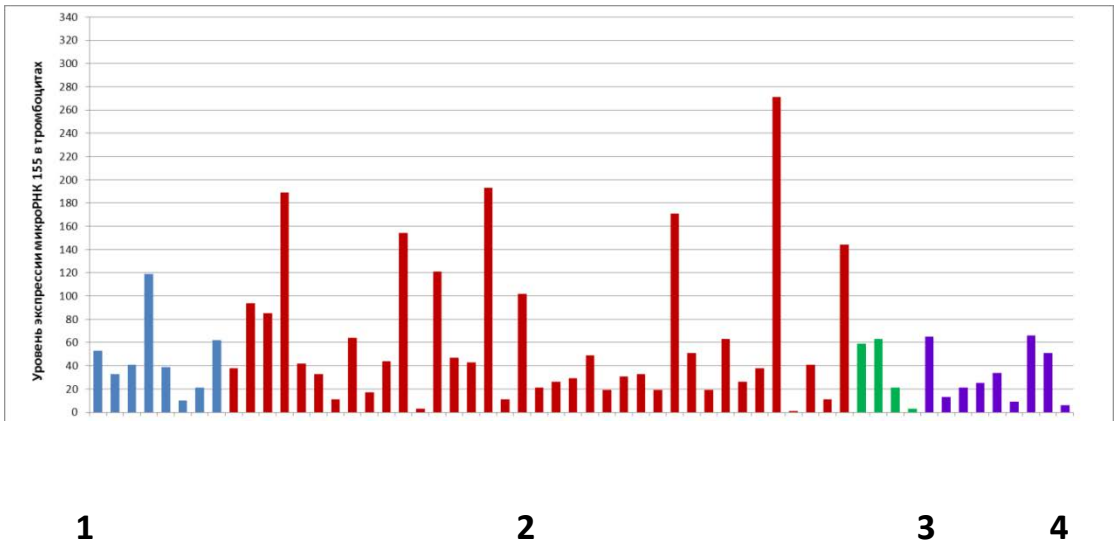

График 1 – Уровень экспрессии микроРНК miR-155 у исследуемых пациентов с ХМО: 1 – контроль, 2 – JAK2+, 3 – CALR+, 4 – без мутаций

Таким образом, разработанный метод определения микроРНК miR-155 позволяет провести количественную оценку и выявить пациентов с выраженными изменениями её экспрессии. Диагностическое и прогностическое значение микроРНК miR-155 требует дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Sang H.P., Shine Y.K., Sun M.L., Jongyoun Yi. et al. Clinical Features, and Prognostic Impact of CALR Exon 9 Mutations in Essential Thrombocythemia and Primary Myelofibrosis: An Experience of a Single Tertiary Hospital in Korea. Ann Lab Med. 2015; 35: 233-237.

2. Tefferi A., Guglielmelli P., Larson D.R., Finke C. et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. Blood. 16; 124(16): 2507-13.

3. Grasedieck S., Sorrentino A., Langer C., Buske C. et. al. Circulating microRNAs in hematological diseases: principles, challenges, and perspectives. Blood. 2013; 121(25): 4977-84.

4. Elton T.S., Selemon H., Elton S.M., Parinandi N.L. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. Gene. 2013; 532(1): 1-12.

5. Zhan H., Cardozo C., Raza A. MicroRNAs in myeloproliferative neoplasms. British Journal of Haematology. 2013; 161: 471–483.

УДК 576.52

ВЛИЯНИЕ НАНОАЛМАЗОВ И ФУЛЛЕРЕНОВ НА МОРФОЛОГИЮ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ КРАТКОВРЕМЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

Сухова К.В.
научный руководитель канд. биол. наук, доц. Мензянова Н.Г.
Сибирский федеральный университет

Наноалмазы (НА) и фуллерены (Ф), биосовместимые углеродные наночастицы (НЧ), в настоящее время широко используются в технологиях «drug delivery». Эффективность углеродных НЧ как транспортных контейнеров определяется возможностями поверхностной конъюгации различных лекарственных агентов. Конъюгированные с НЧ лекарственные агенты вводятся в кровеносное русло и доставляются в органы-мишени. Использование кровеносной системы в качестве транспортного канала определяет одну из актуальных проблем технологий «drug delivery»: взаимодействие НЧ с клеточными элементами крови. Внутрисосудистые эффекты наночастиц изучены недостаточно, но уже сейчас очевидно, что мембранотропная активность НЧ может определять различные «побочные» эффекты в кровеносном русле.

В связи с этим в представленной работе изучали влияние НА и Ф на морфологию эритроцитов здоровых доноров в условиях кратковременного культивирования *in vitro*. Адекватные модельные системы *in vitro* актуальны для скрининга, прогнозирования биологических эффектов НЧ и целевой функционализации НЧ. Эритроциты – многочисленная клеточная популяция крови, от которой зависит транспорт кислорода. Причем, эффективность этого транспорта определяется функциональной активностью мембран эритроцитов:

1) диффузия (или транспорт через определенные каналы) кислорода через мембрану эритроцитов в значительной степени зависит от физико-химических свойств мембранных липидов;

2) липидная фаза мембраны определяет деформируемость эритроцитов, от которой зависит их способность «протискиваться» в капилляры, диаметр которых меньше собственных размеров клеток.

Кроме того, перестройки липидной фазы мембран приводят к значительным изменениям морфологии клеток: классический двояковогнутый диск превращается в аномальные морфологические типы – эхиноциты, стоматоциты, сфероциты, плоские диски и т.д. Это позволяет оценивать влияние НЧ на липидную фазу мембран, основываясь на морфологических изменениях эритроцитов.

В представленной работе морфологию эритроцитов изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Было показано, что углеродные НЧ приводили к появлению аномальных морфологических типов и резкому снижению численности клеток с классической морфологией (рис. 1а). Причем, количественные соотношения между аномальными морфологическими классами зависели не только от типа НЧ (НА или Ф), но и от наличия белковой короны на поверхности НЧ. Так, в присутствии НЧ с белковой короной значительно увеличивалась численность чашевидных клеток (клеток с глубокими инвагинациями в центре) (рис. 1б) и плоских клеток с волнистым краем (рис.1в). В варианте НЧ без белковой короны преобладал морфологический тип плоских клеток со слабовыраженной вогнутой зоной в центре клетки (рис.1г).

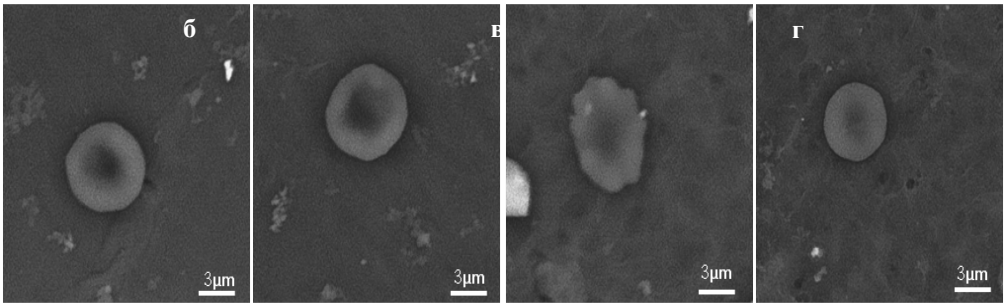

Рис.1 – Морфологические типы эритроцитов в кратковременной культуре in vitro. 36 ч культивирования в среде DMEM с 10% фетальной сывороткой. а – нормоциты; б – чашевидные эритроциты; в – эритроциты с волнистым краем; г – плоские эритроциты (дискоциты)

Было показано, что появление аномальных морфологических типов эритроцитов в присутствии углеродных НЧ не влияло на активность восстановления МТТ до формазана. Это позволяет предполагать, что индуцированные НЧ морфологические изменения не приводили к снижению жизнеспособности клеток.

Эффекты НЧ на уровне морфологии мембран могут реализоваться с участием нескольких молекулярных механизмов.

1. НЧ могут активировать нерецепторный, механо-химический сигналинг. При взаимодействии НА с мембраной возникают локальные изменения в микрорельефе, создающие чрезмерное физико-химическое напряжение, которое активирует мембраносвязанные фосфолипазы. Деградация мембранных фосфолипидов сопровождается морфологическими изменениями мембраны. Через механо-химический сигналинг могут реализоваться и перестройки клеточного цитоскелета, который играет важную роль в поддержании классической формы эритроцитов.

2. НЧ могут проникать в мембрану, но не выходить внутрь клетки. Накопление НЧ в мембране приводит к изменению ее морфологии. Кроме того, депонирование НЧ в мембране активирует продукцию активных форм кислорода в мембране и процессы перекисного окисления липидов. Накопление липидных перекисей в липидной фазе мембраны приводит к изменению ее морфологии.

Формирование белковой короны на поверхности НЧ увеличивает размеры частиц и изменяет физико-химические свойства их поверхности. Эти изменения могут значительно модифицировать механо-химический сигналинг и внутримембранные эффекты НЧ и в конечном итоге определять морфологические особенности мембран, существенно отличающиеся от морфологических перестроек, характерных для «голых» НЧ.

Полученные результаты свидетельствуют о мембранотропной активности углеродных НЧ *in vitro* и позволяют предполагать подобные эффекты и в сосудистом русле. Кратковременное культивирование эритроцитов с НЧ *in vitro* может быть использовано для прогнозирования внутрисосудистых эффектов НЧ.

УДК 616.381-002

ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ОТ ЭТИОЛОГИИ РАСПРОСТРАНЁННОГО ГНОЙНОГО ПЕРИТОНИТА

Татаркина А.Е., Беленюк В.Д. Гвоздев И.И., Мошев А.И., Шапкина В.А.
научный руководитель д-р мед. наук Савченко А.А.
Сибирский федеральный университет,
Научно-исследовательский институт медицинских проблем севера,
Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого

Несмотря на достижения современной медицины, проблема лечения распространенного гнойного перитонита, по-прежнему является одной из самых серьезных в абдоминальной хирургии [1,2]. Летальность при распространенном гнойном перитоните (РГП) колеблется на уровне от 11 до 40%, а в случае генерализации инфекции и развития полиорганной недостаточности может достигать 80% [1,2,3]. Важную роль в развитии РГП играет система иммунитета и в частности лимфоциты, активно вовлекающиеся в процессы борьбы с инфекционным и бактериальным заражениями [3,4,5]. Т-лимфоциты ($CD3^+$) составляют 70-80% от всех лимфоцитов крови и играют важную роль в приобретённом иммунном ответе [4,5,6]. Т-лимфоциты подразделяются на Т-хелперы ($CD3^+$ $CD4^+$) и Т киллеры ($CD3^+$ $CD8^+$), различающиеся выполняемыми функциями [7,8]. В-лимфоциты ($CD19^+$) составляют 10-15% от всех лимфоцитов и играют важную роль в обеспечении гуморального иммунитета [7,8,9]. В-клетки подразделяются на В-клетки памяти ($CD19^+$ $CD27^+$), обеспечивающие долговременный иммунитет и наивные В-клетки ($CD19^+$ $CD27^-$), готовые к активации и обеспечению противобактериальной защиты. Так же В-лимфоциты можно разделить на В1 ($CD19^+$ $CD5^+$), минорную популяцию составляющую около 5% от общей популяции, они локализуются в основном в барьерных тканях. И В2 ($CD19^+$ $CD5^-$), являющиеся основной популяцией В-клеток [8,9]. Для оценки популяционного состава клеток крови нами применялся метод проточной цитометрии [5,9,10].

Целью данного исследования явилась оценка Т- и В- лимфоцитов у больных распространённым гнойным перитонитом различной этиологии.

Материалы и методы

На базе Красноярского краевого гнойно-септического центра Краевой клинической больницы г. Красноярска обследовано 32 пациента с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, в возрасте 30 – 65 лет (средний возраст пациентов составил 46 лет). Из исследования были исключены пациенты, у которых причиной РГП являлись: острый деструктивный панкреатит (панкреонекроз), тотальный мезентериальный тромбоз, онкологические заболевания, туберкулёз, беременность. Все пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от этиологии перитонита: 1 группа – тупая травма живота и послеоперационный перитонит (n=13); 2 группа - заболевания желудка, тонкой и толстой кишки (n=19). Забор крови при РГП производили перед операцией. В качестве контроля обследовано 40 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Забор крови контрольной группы осуществлялся в Красноярском краевом центре крови №1. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинской Декларации 2001 г.

Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой пятицветной иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (BeckmanCoulter, USA). Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [5,9]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VerasLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (BeckmanCoulter, USA) [5]. В каждой пробе анализировали не менее 50000 лимфоцитов.

Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартального размаха в виде 25 и 75 процентилей (C_{25} – C_{75}). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney U test).

Результаты и обсуждение

На основании проведенного исследования, у пациентов с распространённым гнойным перитонитом (1 и 2 группа), по сравнению с третьей контрольной группой были выявлены количественные и качественные изменения в составе иммунокомпетентных клеток. Было обнаружено достоверное увеличение содержания общих лейкоцитов при РГП в сравнении с контролем, сохраняющееся в ходе всего лечения.

Таблица 1 - Содержание Т- и В- лимфоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом (Me, C_{25} – C_{75})

	Контроль	Группа 1 (n=13)	Группа 2 (n=19)
Лимфоциты абсолют. сод.	2,18 (1,68-2,45)	0,99 (0,69-1,38) p=0,005	0,83 (0,60-1,18) p=0,001
Лимфоциты %	36,00 (31,00-39,15)	12,00 (6,00-16,00) p=0,005	12,00 (6,00-19,00) p=0,001
$CD3^+CD4^+$ $CD127^{Low}$ $CD25^{High}CD62l^+$	3,78 (2,91-4,87)	4,91 (2,72-7,67)	5,99 (5,51-10,74) p=0,001
$CD3^+CD4^+$ $CD62l^+$	29,42 (24,58-35,88)	32,18 (29,81-53,65)	49,09 (42,95-73,63) p=0,001
$CD3^+$	71,92 (68,00-75,72)	73,76 (66,98-81,75)	76,51 (73,10-82,21) p=0,02
$CD3^+CD62l^+$	42,24 (36,69-51,03)	38,03 (33,33-46,97)	51,00 (47,70-54,95) p=0,02
$CD3^+CD4^+$ $CD127^{Low}$ $CD25^{High}$	5,49 (4,06-6,74)	7,74 (3,50-11,21)	10,85 (6,79-17,45) p=0,001
$CD3^+CD4^+$	43,20 (35,62-46,52)	45,27 (38,99-47,54)	54,04 (49,94-57,43) p=0,007
$CD19^+$	12,80 (10,75-14,29)	14,59 (8,63-20,01)	10,39 (7,98-17,41)
$CD19^+CD27^+$ $CD23^+$	1,86 (1,07-2,62)	2,94 (1,03-4,12)	1,07 (0,32-2,02)
$CD19^+CD27^-$ $CD23^+$	9,04 (6,75-11,46)	22,81 (14,32-39,10) p=0,02	12,57 (8,34-91,66)
$CD19^+CD5^-$ $CD23^+$	9,32 (7,50-11,69)	22,57 (14,07-35,18) p=0,03	12,86 (7,56-25,00)

$CD19^+CD27^-$	9,44 (7,40-11,97)	9,52 (6,44-16,68)	8,92 (5,16-12,12)
$CD19^+CD27^+$	2,32 (1,63-3,22)	3,63 (2,02-4,77)	2,00 (1,08-3,82)
$CD19^+CD5^+$	1,61 (1,20-2,66)	0,76 (0,36-1,59) p=0,008	0,64 (0,44-1,73) p=0,006
$CD3^+CD8^+$	26,92 (21,70-30,76)	14,81 (11,36-20,45) p=0,03	25,86 (18,89-28,37)

В первой группе было обнаружено значительное снижение количества Т-киллеров ($p<0,05$). В то же время остальные популяции Т-лимфоцитов не претерпели достоверных изменений относительно контрольных значений (табл. 1). Это может указывать на перераспределение ресурсов организма и ослабление цитотоксического звена иммунитета в пользу гуморального иммунитета. Во второй группе было зафиксировано достоверное повышения количества общих Т-лимфоцитов ($p<0,05$). В большей степени повышение коснулось Т-хелперов ($p<0,001$) и Т-reg ($p<0,001$), в тоже время количество Т-киллеров осталось неизменным (табл. 1). По мимо количественных изменений, в популяции Т-хелперов увеличилось количество клеток активно экспрессирующих CD62l ($p<0,001$), что указывает на активацию процессов миграции клеток в очаг воспаления.

При анализе В-клеточного звена иммунитета в первой группе было показано значительное снижение В1-клеток ($p<0,01$), относительно контрольной группы (табл. 1). Остальные популяции В-клеток не подверглись значительным изменениям. В то же время значительно повысилось количество В2-клеток ($p<0,05$) и В-клеток ($p<0,05$) памяти активно экспрессирующих CD23, что указывает на активацию В-клеточного звена и усиление гуморального иммунитета. Во второй группе, по аналогии с первой, значительному снижению подверглась популяция В1-клеток ($p<0,01$) (табл. 1). Значительно снизилась экспрессия CD23, на поверхности наивных В-клеток ($p<0,05$) и В-клеток памяти ($p<0,01$). Подобная картина указывает на снижение уровня активации В-лимфоцитов и как следствие торможение гуморального иммунного ответа.

Заключение

В ходе исследования были обнаружены количественные и качественные изменения Т- и В-лимфоцитов крови указывающие на разнонаправленность изменений протекающих в системе иммунитета в зависимости от этиологии РГП. В группе, где причиной развития РГП явилось травмирующее воздействие, было зафиксировано снижение эффективности цитотоксического иммунного ответа и активация гуморального иммунитета. В тоже время в группе с РГП, вызванным заболеваниями желудочно-кишечного тракта, была отмечена активная миграция Т-хелперов в очаг воспаления, но в то же время активации гуморального иммунитета не наблюдалось. Что указывает на активацию не специфического иммунного ответа.

Список литературы

1. Ярилин А.А. Иммунология. ГЭОТАР-Медиа, Москва 2010, 752.
2. Бойко В.В., Криворучко И.А., Тесленко С.Н., Сивожелезов А.В. Распространенный гнойный перитонит. Харьков: Прапор, 2008. 280 с.
3. Беленюк В.Д., Гвоздев И.И., Мошев А.В., Кощеев В.Н., Особенности метаболизма лимфоцитов при распространенном гнойном перитоните // Вестник ХГУ. 2014. № 8. С. 24-26
4. Савченко А.А., Борисов А.Г. Основы клинической иммунометаболомики. Новосибирск: Наука, 2012. 263 с.

5. Luider J.1., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. Lab. Hematol. 2004, V. 10, P. 102–108.
6. Борисов А.Г. Кластерный анализ типов иммунных нарушений при инфекционно-воспалительных заболеваниях // Российский иммунологический журнал, 2014, Т. 8, № 4, С. 1002-1011.
7. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т.8, № 4, С. 947–964
8. Кудрявцев И.В., Елезов Д.С. Анализ основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови на основании уровня экспрессии CD27, CD28, CD45R0 и CD62L // Российский иммунологический журнал, 2013, Т.7, №2-3, С.57-61.
9. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуоримерического анализа // Медицинская иммунология, 2015, Т. 17, № 1, С. 19-26
10. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014, Т.8, № 4, С. 947–964

УДК 616.155.191-021.3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ВЕРТИКАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПААГ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ НАЛИЧИЯ МУТАЦИЙ В 12 ЭКЗОНЕ ГЕНА JAK2

Харсекина А.Е.
научный руководитель канд. биол. наук Субботина Т.Н.
Сибирский федеральный университет,
Красноярский филиал гематологического научного центра
Министерства здравоохранения России

Для подтверждения диагноза одного из наиболее распространенных Ph-негативных хронических миелопролиферативных заболеваний (ХМПЗ) – истинной полицитемии (ИП) в соответствии с клиническими рекомендациями ВОЗ [1] достаточно наличия высокого содержания гемоглобина и гематокрита, а также выявления какой-либо из клинически значимых соматических мутаций в гене JAK2. Ключевым звеном патогенеза ИП является независимая активация JAK-STAT сигнального пути, чаще всего обусловленная мутацией V617F в 14-м экзоне гена JAK2 [2]. Для определенного числа V617F-отрицательных больных с клиническим диагнозом ИП характерны иные мутации в гене JAK2, происходящие в онко-ассоциированной последовательности 12-го экзона (микроделеции, микроинсерции и точечные мутации, затрагивающие аминокислотные остатки в положении 532–547 белка Jak2). Согласно информации, представленной в базе данных COSMIC [3] в этом фрагменте описано более 40 соматических мутаций, встречающихся с разной частотой и имеющих клиническое значение для подтверждения ИП [4, 5]. Частота встречаемости таких мутаций среди больных ИП составляет около 5% для европейской популяции [6] и около 13% для китайской [5]. Клиническая картина течения заболевания и факторы риска развития тромбоза и вторичного миелофиброза у больных ИП, обусловленные возникновением мутации в 12-м экзоне гена JAK2, не имеют значимых различий от соответствующих проявлений у V617F-положительных больных [7].

Ранее нами был предложен метод анализа данных мутаций в количественном формате методом пиросеквенирования [8], но проведение анализа в таком формате для всех пациентов, имеющих высокую клинико-гематологическую вероятность ИП и с отсутствием мутации V617F в 14 экзоне гена JAK2 достаточно дорого и трудоёмко. В связи с этим возникает потребность в предварительном скрининговом (качественном) тесте, который позволил бы удешевить процедуру выявления данных мутаций. На наш взгляд, таким скрининговым методом может стать метод вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

Таким образом, целью данной работы стала оценка возможности использования метода вертикально электрофореза в ПААГ для качественной оценки наличия мутаций в 12 экзоне гена JAK2.

Для проведения анализа были выбраны образцы ДНК от двух пациентов с диагнозом ИП и ранее выявленными соматическими мутациями в 12 экзоне гена JAK2: N542-E543del и I540-E543delinsKK. Данные мутации были определены с помощью метода пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24 как в формате de novo (SQA), так и в количественном формате (AQ) с использованием последовательности добавления нуклеотидов, соответствующей обнаруженной мутации, для определения уровня аллельной нагрузки выявленной мутации в образце. Выделение ДНК проводили из лейкоцитов 250 мкл цельной периферической крови с помощью набора ДНК-сорб-В (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии, Москва).

Важно отметить, что количественное определение уровня аллельной нагрузки для проб пациентов с выявленными мутациями проводилось в динамике развития заболевания. Анализ для пациента с мутацией N542-E543 del проводили 5 раз. Уровень аллельной нагрузки составил: в августе 2013 – 15%, в январе 2015 – 28%, в июне 2015 – 36%, в августе и октябре 2015 – 40%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе развития заболевания аллельная нагрузка у больного возрастает и за 26 месяцев наблюдения этот показатель вырос более чем в 2 раза. Анализ для пациента с мутацией I540-E543delinsKK проводили 3 раза. Уровень аллельной нагрузки составил: в июне 2015 – 11%, в августе 2015 – 12%, в ноябре 2015- 11%. Можно отметить, что на протяжении 5 месяцев заболевания уровень аллельной нагрузки оставался стабильным.

Далее выбранные образцы ДНК от двух пациентов (5 образцов ДНК от первого пациента и 3 образца ДНК от второго пациента), были проанализированы методом вертикального электрофореза в 8% ПААГ. Для этого предварительно проводили ПЦР в реальном времени с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green («СИНТОЛ», Москва). Данная ПЦР с этапом плавления проводилась на приборе CFX96, программа амплификации взята из статьи «Rapid identification of JAK2 exon 12 mutations using high resolution melting analysis» Amy V. Jones, 2008. [9]. Праймеры для ПЦР также были заимствованы из данной статьи. Количество вносимой ДНК в реакционную пробу – 30нгр, размер ампликонов дикого типа – 126bp. С продуктами амплификации далее проводили электрофорез в 8%-ном ПААГ с использованием маркера веса pUC19/Msp I (размер фрагментов от 501 до 26 bp).

При анализе полученной электрофореграммы (рис. 1) на дорожках от обоих пациентов с мутациями чётко визуализируются основной фрагмент, соответствующий дикому типу, а ниже тонкой полосой – продукты соответствующие мутантным аллелям (на уровне примерно 120bp). Кроме того, дополнительно визуализируются по 2 полосы выше фрагмента дикого типа, соответствующие гетеродуплексам (на уровне 200 и 250 для пациента с мутацией N542-E543 del и на уровне 180 и 200 для пациента с мутацией I540-E543delinsKK), которые образованы сочетанием фрагментов дикого и мутантного типов аллелей.

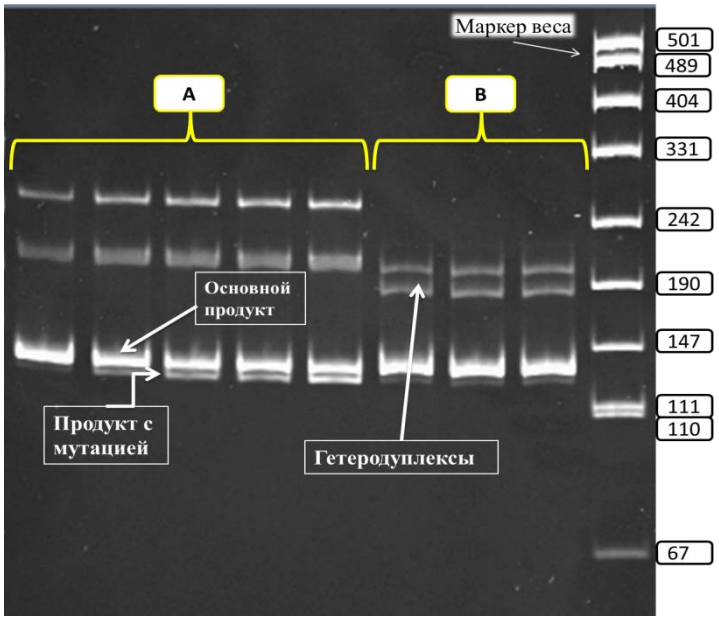

Рис. 1 – Электрофореграмма пациентов A и B с мутациями N542-E543del и I540-E543delinsKK соответственно

На следующем этапе работы была определена чувствительность предлагаемого метода. Для этого использовали ДНК, выделенную из заклонированных образцов, несущих выявленные ранее мутации N542-E543del и I540-E543delinsKK. Данные образцы ДНК были разведены в определенных концентрациях образцом ДНК дикого типа. После разведения уровень аллельной нагрузки в анализируемых пробах составил 0%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% и 100%. При анализе электофореграммы (рис. 2) видно, что гетеродуплексы визуализируются при всех выбранных разведениях ДНК, как в случае с мутацией N542-E543del, так и в случае с мутацией I540-E543delinsKK. В то же время нужно отметить, что полоса, соответствующая мутантному аллелю в обоих случаях визуализируется, начиная от уровня аллельной нагрузки 12,5%.

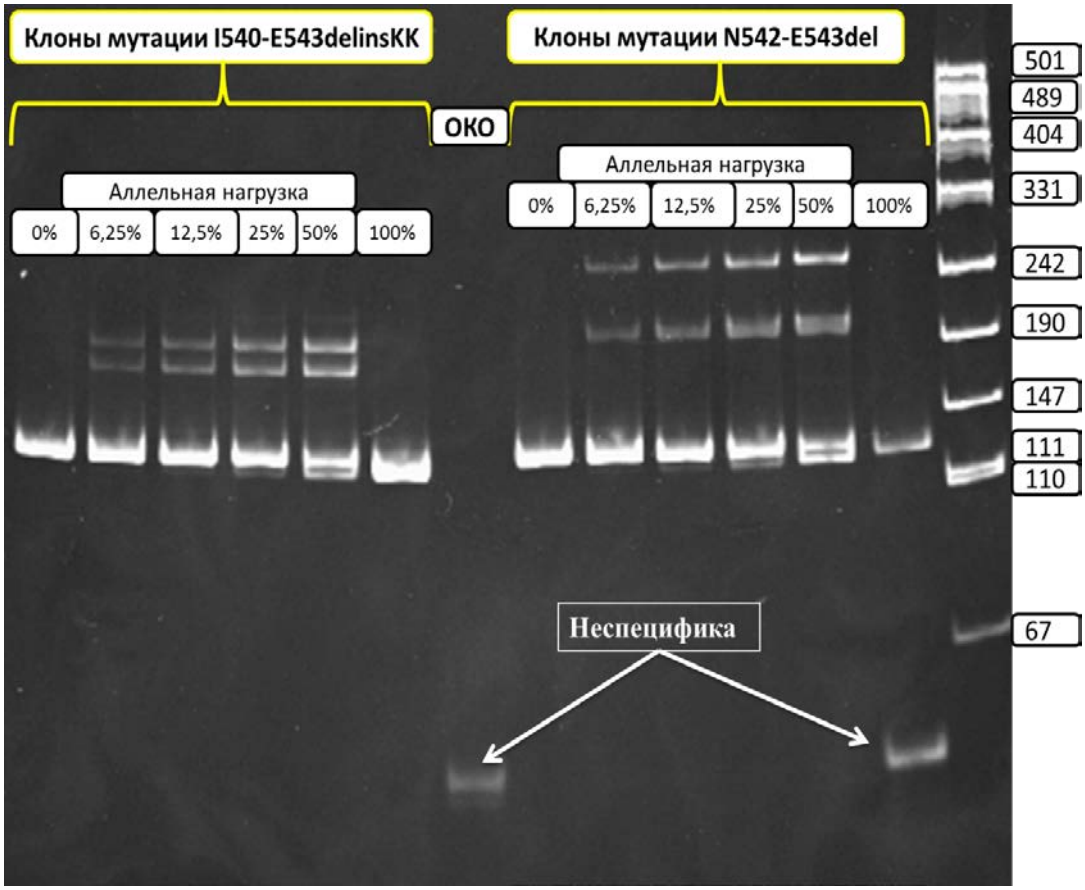

Рис. 2 – Электрофореграмма с оценкой чувствительности метода вертикального электрофореза в 8% ПААГ

Таким образом, в ходе проведенной работы показано, что предлагаемый подход с использованием метода вертикального электрофореза в ПААГ достаточно хорошо подходит для выявления, по крайней мере, двух мутаций в 12 экзоне гена JAK2, обуславливающих развитие ИП. Поскольку обе мутации связаны с делецией 6-ти нуклеотидов, то можно предположить, что также хорошо данный метод будет выявлять любые делеции и\или вставки в 12 экзоне гена JAK2, описанные в литературе и имеющее диагностическое значение для дифференцировки случаев ИП. Чувствительность метода в случае анализа мутаций N542-E543del и I540-E543delinsKK – от 6% присутствия мутантного аллеля в пробе пациента.

Данный подход с использованием электрофореза в ПААГ может быть использова для дальнейшего качественного (неколичественного) анализа мутаций в 12 экзоне гена JAK2, что по себестоимости будет гораздо дешевле метода пиросеквенирования и позволит использовать дорогостоящий метод пиросеквенирования для уточнения типа мутации и для количественной оценки аллельной нагрузки лишь в тех пробах, которые заранее охарактеризованы более дешёвыми методами.

Список литературы

1. Tefferi A., Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 WHO criteria and point-of-care diagnostic algorithms. Leukemia. 2008; 22(1): 14–22.
2. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., East C., Fourouclas N., Swanton S., et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet. 2005; 365(9464): 1054--61.
3. Catalog Of Somatic Mutations In Cancer http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/
4. Scott L.M. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. Am. J. Hematol. 2011; 86(8): 668--76.
5. Wu Z., Zhang X., Xu X., Chen Y., Hu T., Kang Z., et al. The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. J. Hematol. Oncol. 2014; 7: 48. doi: 10.1186/s13045-014-0048-6.
6. Pardanani A., Lasho T.L., Finke C., Hanson C.A., Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. Leukemia. 2007; 21(9): 1960--3.
7. Passamonti F., Elena C., Schnittger S., Skoda R.C., Green A.R., Girodon F., et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. Blood. 2011; 117(10): 2813--6.
8. Субботина Т.Н., Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Харсекина А.Е., Васильев Е.В., Ольховский И.А., Шипулин Г.А. Случай развития гомозиготности мутации N542-E543del в 12-ом экзоне гена JAK2 у пациента с истинной полицитемией // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. - Т.60, №9. - С. 37.
9. Jones A. V. et al. Rapid identification of JAK2 exon 12 mutations using high resolution melting analysis //Haematologica. – 2008. – Т. 93. – №. 10. – С. 1560-1564.

УДК 613.63:546.56

ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЦИДНОГО ВЛИЯНИЯ МЕДНОЙ ВОДЫ

Чечебейкина Е.Н.
научный руководитель Янковская Т.В.
Самарский государственный технический университет

Медь - элемент I группы периодической системы. Ковкий, пластичный металл, имеет красноватый цвет, обладает высокой электро- и теплопроводностью. В природе встречается виде таких минералов как борнит, халькопирит, малахит и виде самородной меди. Этот металл используется для изготовления трубопроводов (в основном водопроводов), электрических проводов и монет. В медицине применяется в качестве противомикробного и прижигающего средства, также используется и в физиотерапии.

Организм усваивает в основном только двухвалентную медь. Концентрируется в большинстве случаев в печени, мозге и сердце. Ежедневная потребность меди составляет 0,5-6 мг (в зависимости от возраста человека). А токсическая доза - 250 мг, которая проявляется как при любом остром отравлении: расстройство желудочно-кишечного тракта, головокружение, тахикардия.

Кладовая меди в бараньих почках и в говяжьей печени. Поступая с пищей, медь всасывается в кишечнике, связывается с альбумином, затем поглощается печенью, оттуда в составе белка цероплазмина возвращается в кровь и доставляется к органам и тканям.

Очень часто медь поступает в наш организм через сточные воды, а постоянная интоксикация является губительной для организма. Известно, что в сетях с применением хлора, в качестве дезинфектанта, на внутренней поверхности медных труб образуется труднорастворимая пленка окиси (тенорит, малахит и др.), которая снижает перенос меди в воду до ничтожных уровней и выполняет роль своеобразной «брони», в том числе в части препятствия коррозии.

Медные браслеты и аппликации меди положительно влияют на организм человека. Например: снимают боль, нормализуют водный и минеральный обмен, уменьшает вредный эффект от радиации и мн. др. Сравнивая электродные потенциалы меди и кожи, можно сделать вывод, что окислителем является медь, которая при соприкосновении с кожей проникает вовнутрь тела, оставляя после себя заметную «медную зелень».

$2Cu + O_2 = 2CuO$

(Электродный потенциал кожи = **10-20 мВ**;
Электродный потенциал меди = **0,337 В**)

Также необходимо, чтобы медные аппликаторы замыкались, так как образовывается электромагнитное поле и, тем самым, усиливает биополе человека.

В другом опыте результаты неоднозначные. При увеличении концентрации меди в 2 раза (20 мин и 40 мин растворы) прорастание улучшилось в 8 раз. При увеличении концентрации в 100 раз (1,5 ч раствор) прорастание не наблюдалось. Из чего можно сделать вывод, что данная концентрация является токсичной.

Известно, что «медный купорос» приводит к нарушению цвета стен в квартире, при избавлении от грибка, оставляет ожоги на коже и мн.др. Стала необходимость определения концентрации дезинфицирующего средства без обжигающего действия, так, например, при лечении ногтевого грибка. С этой целью проведен следующий опыт - исследование бактерицидной активности от концентрации меди. Изготовлены

образцы: р-р медного купороса ($CuSO_4$), также так называемая «медная» вода, которая приготовлена по методике половинного выкипания объема воды (концентрация содержания меди составляет: $2{,}17\times10^{-4}$ моль/л) и является стимулятором активности в клетках. Также прокипячена медная проволока в течение 1,5 ч, концентрация которой $7{,}8\times10^{-3}$ моль/л. Были подготовлены 3 образца плесени на хлебе. После четырех кратного опрыскивания в течение двух суток получены следующие результаты: р-р $CuSO_4$ остановил рост плесени, образец засох, при концентрации $7{,}8\times10^{-3}$ моль/л снизила рост плесени, а при концентрации $2{,}17\times10^{-4}$ моль/л – рост плесени продолжался, бактерицидного влияния не было замечено (рис.1).

Рис.1 – Бактерицидное влияние меди на развитие грибков

Можно сделать вывод, что именно раствор, концентрация меди которой $7{,}8\times10^{-3}$ моль/л, является тем средством, которое оказывает подавляющее влияние на развитие различных видов грибков без нарушения целостности строительных и кожных поверхностей.

Список литературы

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 1983. С. 752.
2. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека. М.: «Мир», 1980. С. 366.
3. Подчайнова В.Н., Медь. М., Свердловск: Металургиздат, 1991. С. 249.
4. Реми Г. Курс неорганической химии. Том 1 // Химия. М. 1967.

УДК 57.085.23

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ

Шидловский И.П., Прудникова С.В., Винокурова Д.А., Николаева Е.Д.
научный руководитель д-р биол. наук Шишацкая Е.И.
Сибирский федеральный университ ет

Бактериальная целлюлоза (БЦ) обладает свойством биологической совместимости, то есть она не токсична, не вызывает аллергии и физического отторжения. [1] Плоская гель-пленка БЦ — это идеальная повязка при пересадке кожи, лечении ран, послеоперационных швов и язв, а также гнойных воспалений, потертостей и пролежней. [2] Гель-пленка БЦ имеет следующие свойства:

— поддерживает оптимальный баланс влажности, стимулирующий заживление;

—пропускает жидкости и газы;

—насыщается лекарственными препаратами и свободно отдает их в поврежденную зону;

—поглощает продукты распада тканей;

— служит физическим барьером для инфекции.

Через тонкую и прозрачную гель-пленку бактериальной целлюлозы можно наблюдать процесс заживления ткани. Особо перспективны композитные раневые покрытия, изготовленные из бактериальной целлюлозы. С этой целью в её состав включают наночастицы серебра или селена, обладающие антимикробными, противовоспалительными и заживляющими свойствами. Такие покрытия используются для лечения ран, термических ожогов и лучевых поражений кожи.[3] Препараты на основе бактериальной целлюлозы можно использовать в регенерации мягких тканей, так же находят применение и как барьер от спаек в хирургии.[4]

Разработан экспериментальный вариант изделия медицинского назначения на основе запатентованного штамма Acetobacter Xyllinus для восстановления целостности кожных покровов и потенциального применения в хирургии.

Для приготовления проб было приготовлено 250 мл питательного раствора содержащего: глюкоза - 2г/100мл, пептон - 0,5г/100 мл, дрожжевой экстракт - 0,5г/100мл, Na_2HPO_4 - 0.27г/100мл, моногидрат лимонной кислоты - 0,115г/100мл. (Hestrin and Schramm) Объем культурального сосуда 25мл. В питательном растворе доводили pH до 4, при котором достигается быстрый рост. Для доведения pH, в качестве эксперимента, для сравнения, использовали уксусную и лимонную кислоты. После приготовления питательный раствор стерилизовался в автоклаве.

В стерилизованные в автоклаве чашки Петри помещали по 25 мл питательного раствора. Затем в чашки помещали с помощью микробиологической петли штамм Acetobacter Xyllinus. Через 5-7 дней образовывалась цельная гель-плёнка бактериальной целлюлозы. Что бы очистить от остатков плёнку помещали в 0,5% раствор NaOH, на 24 часа на шейкер 90-100 об. мин. После промывки в дистиллированной воде, для нейтрализации pH плёнки помещали в 0,5% раствор уксусной кислоты, после чего снова промывали дистиллированной водой. Затем поместили плёнки в физиологический раствор и стерилизовали в автоклаве.

Получен пласт по размеру культивационного сосуда. Толщина плёнок составляет 2-4 мм. С лимонной кислотой плёнки получились массой от 6,69 г до 20,99 г. С уксусной

кислотой от 13,61 г до 28,64 г. Так как для медицинских целей площади плёнок, выращенных в чашках Петри, недостаточно, было решено увеличить их площадь, используя стеклянные контейнеры шириной около 10 см и длинной около 20 см, в результате чего были получены плёнки соответствующих размеров с массой от 157,5 г до 215,7 г. Исходя из предыдущего эксперимента, для доведения Ph до 4 использовали уксусную кислоту. Так же для увеличения прочностных характеристик в рамках эксперимента для обращивания использовали полипропиленовые и полиэстровые хирургические сетки. В результате хирургические сетки были прикреплены к плёнкам из бактериальной целлюлозы.

Проведена сравнительная оценка прикрепляемости и пролиферации фибробластов, выделенных из заушной области, на матриксах из целлюлозы двух типов: нативная (очищенная от бактериальной биомассы и автоклавированная при 1 Атм), высушенная (стерилизованная в УФ в течение 2 часов в стерильном ламинаре). Оба типа целлюлозы с помощью специальной формы нарезали на диски диаметром 10 мм и помещали в культуральные планшеты. Перед засевом предварительно залили полной питательной средой (ДМЕМ с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка и раствора антибиотиков).

Рассев клеток провели из расчета 100 т.кл/лунку. Использованы клетки 5 пассажа, культивирование проводили в полной питательной среде с заменой каждые три дня, в 5% атмосфере CO_2 при 37 °С. Способность клеток к адгезии и пролиферации определяли в МТТ-тесте и по окрашиванию клеток флуорисцентными красителями. По результатам эксперимента, клетки лучше адгезировали на поверхности предварительно высушенной целлюлозы, что в дальнейшем влияло на пролиферацию клеток.

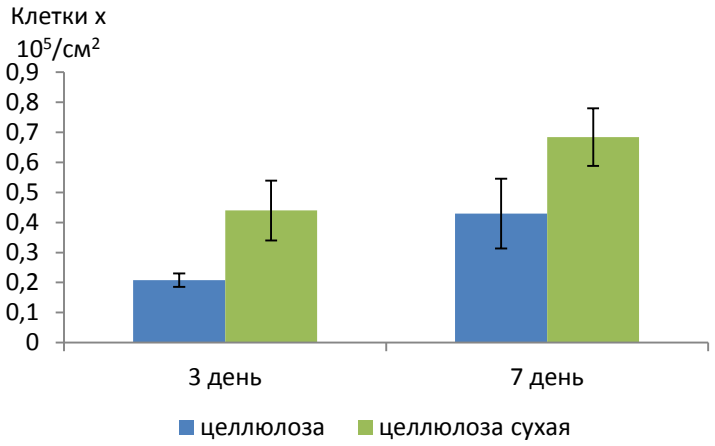

График 1 - Результаты МТТ теста на нативной и регидратированной БЦ

Так как на высушенной бактериальной целлюлозе прикрепляемость и пролиферация фибробластов были выше, в последующем тесте взяли высушенную целлюлозу. Проведён МТТ-тест на матриксах из целлюлозы двух типов:1. Регидратированная плёнка, автоклавированная при 0,5 Атм, дополнительно стерилизованная под УФ излучением в течение 2ч. 2. Регидратированная плёнка, автоклавированная при 0,5 Атм с добавлением антибиотика. Оба типа целлюлозы с

помощью специальной формы нарезали на диски диаметром 10 мм и помещали в культуральные планшеты. Перед засевом предварительно залили полной питательной средой (ДМЕМ с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка и раствора антибиотиков).

Рассев клеток провели из расчета 50 т.кл/лунку. Использованы клетки 5 пассажа, культивирование проводили в полной питательной среде с заменой каждые три дня, в 5% атмосфере CO_2 при 37 °С.

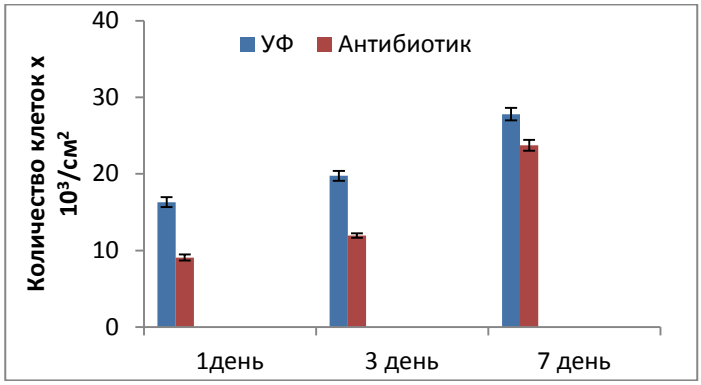

График 2 - Результаты МТТ теста на регидратированной бц стерилизованной разными способами

Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности разработанной гель плёнки бактериальной целлюлозы для восстановления мягких тканей и использования в хирургии.

Список литературы

1. Митрофанов Р. Ю., Будаева В. В., Сакович Г. В. Получение и свойства гель-пленки бактериальной целлюлозы //Химия в интересах устойчивого развития. – 2010. – Т. 18. – №. 587. – С. 592.

2. Венгерович Н.Г. Антоненкова Е.В. Андреев В.А. Зайцева О.Б. Хрипунов А.К. Попов В.А. Применение биоактивных наноматериалов при раневом процессе -2011.

3. Хрипунов А. К. и др. исследование нанокомпозитов на основе гидратированных фосфатов кальция и целлюлозы Acetobacter Xylinum //Физика и химия стекла. – 2008. – Т. 34. – №. 2. – С. 248-259.

4. Венгерович Н.Г. , Хрипунов А.К. , Рузанова Э.А. , Никифоров А.С. Исследование возможности применения бактериальной целлюлозы на этапах медицинской эвакуации - 2014.