

Научная конференция

Медицинская геномика и протеомика

9 - 13 сентября 2009 Новосибирск



Российская академия наук
Сибирское отделение

Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Научная конференция

Медицинская геномика и протеомика



9-13 сентября 2009
Новосибирск

УДК 577.1
ББК 28.072



*Издание осуществлено при поддержке Российского фонда
фундаментальных исследований (проект № 09-04-06076-з)*

Медицинская геномика и протеомика. Новосибирск: ИХБФМ СО РАН, 2009. — 208 с.

Сборник содержит материалы научной конференции «Медицинская геномика и протеомика». Предназначен для широкого круга биохимиков, биофизиков, генетиков, специалистов в молекулярной и клеточной биологии.

УДК 577.1
ББК 28.072

© Коллектив авторов, 2009
© Оформление, А. А. Черноносков, В. В. Коваль, 2009
© Рисунки на обложке, appler – Fotolia.com, 2009
Tryfonov – Fotolia.com, 2009
© ИХБФМ СО РАН, 2009

Все права защищены. Полное или частичное копирование (любым известным способом) материалов запрещено. Согласование использования текстов производится с их авторами; использование материалов сборника – с издателем.

Глубокоуважаемые коллеги,

мы рады приветствовать Вас – участников научной конференции, организуемой Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, «Медицинская геномика и протеомика».

Целью конференции является обсуждение проблем, связанных с созданием новых биомаркеров заболеваний и персонализированной медициной, генодиагностикой и генотерапией, применением масс-спектрометрии в медицине.

В рамках конференции будут проведены отчетные сессии по Программе РАН «Фундаментальные науки – медицине» и Программе СО РАН «Геномика, протеомика и биоинформатика».

Программа конференции предполагает работу по секциям:

- Биомаркеры заболеваний
- Применение масс-спектрометрии в медицине
- Геномика и персонализированная медицина
- Генотерапия и генодиагностика
- Протеомика систем, обеспечивающих экспрессию и стабильность генома человека
- Программа РАН «Фундаментальные науки – медицине»

Конференция проводится при поддержке



Российская
академия наук
www.ras.ru



Российский фонд
фундаментальных
исследований
www.rfbr.ru



Сибирское отделение
Российской
академии наук
www.sbras.nsc.ru

Научный организационный комитет

***Сопредседатель
академик РАН Власов В. В.***

*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск*

***Сопредседатель
академик РАН Сагдеев Р. З.***

*Международный томографический центр СО РАН,
Новосибирск*

академик РАН Кнорре Д. Г.

*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск*

академик РАН Макаров А. А.

*Институт молекулярной биологии
им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*

академик РАН Скрябин К. Г.

Центр «Биоинженерия» РАН, Москва

академик РАН Грачев М. А.

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

член-корр. РАН Лаврик О. И.

*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск*

академик РАН Арчаков А. И.

*НИИ биомедицинской химии им В. Н. Ореховича
РАН, Москва*

академик РАН Козлов В. А.

*НИИ клинической иммунологии СО РАН,
Новосибирск*

академик РАН Пузырев В. П.

Институт медицинской генетики СО РАН, Томск

д.б.н., профессор Зенкова М. А.

*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск*

д.х.н., профессор Фёдорова О. С.

*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск*

Организационный комитет

Председатель: д.х.н., профессор Фёдорова Ольга Семёновна
Секретарь: к.х.н. Васильева Инна Анатольевна

Члены комитета:
д.б.н., профессор Зенкова М. А.
д.м.н., профессор Лифшиц Г. И.
к.х.н. Коваль В. В.
к.х.н. Черноносков А. А.
Пинаева Е. Н.

Генеральные спонсоры



Объединяя решения...



Являясь поставщиком комплексных решений, компания «ОПТЭК» представляет всю линейку приборов **Carl Zeiss**: диагностическое оборудование для офтальмологии, операционные микроскопы, кольпоскопы; световые, лазерные сканирующие и электронные микроскопы и нанотехнологические системы, гистологическое оборудование; очковая оптика; контрольно-измерительные машины.

Проведение гарантийного и постгарантийного обслуживания.

Carl Zeiss

в России и странах СНГ

Москва, 105005, Денисовский пер., 26, тел: (495) 933-51-51, факс: (495) 933-51-55, office@zeiss.ru;
Новосибирск, 630058, ул. Русская, 41/1, оф.4, тел.: (383) 330-00-34, факс: (383) 330-00-35, office-nsk@zeiss.ru;
Санкт-Петербург, 197022, ул. Академика Павлова, 5, литер "Е", тел.: (812) 702-08-11, факс: (812) 702-08-12, office-spb@zeiss.ru;
Екатеринбург, 620028, ул. Татищева, 98, оф. 14, тел./факс: (343) 251-52-62, office-ural@zeiss.ru;
Киев, 04070, ул. Ильинская, 14/6, тел.: +380 (44) 581-29-00, факс: +380 (44) 581-29-02, office@zeiss.ua;
Алматы, 050008, ул. Шевченко, 146, оф.1, тел.: (727) 327-38-10, факс: (727) 328-74-70, office-kz@zeiss.ru;
Ташкент, 700000, Квартал Ц-1, 32/1а, тел.: +998 (71) 136-76-69, 132-08-53, факс: +988 (71) 136-77-88, info@zeiss.uz

www.zeiss.ru



We make it visible.

Платформа для исследований живых клеток Cell Observer SD

Интеграция всех компонентов для исследования живых клеток в единую систему

Длительные наблюдения с минимальной фототоксичностью

3D деконволюция и деконволюция по времени

Синхронизация аппаратного обеспечения, одновременная работа двух камер

Платформа для 3D технологий : структурированное освещение, конфокальная микроскопия, SD технология



Carl Zeiss

в России и СНГ

105 005, **Москва**, Денисовский пер., 26 тел.: (495) 933 51 51 тел.: 8 800 2000 567, факс: (495) 933 51 55
E-mail: office@zeiss.ru; 197 022, **Санкт-Петербург**, ул. Академика Павлова, 5, литер «Е» тел.: (812) 702 08 11 факс: (812) 702 08 12 E-mail: office-spb@zeiss.ru; 630 058, **Новосибирск**, ул. Русская, 41/1, к.4 тел.: (383) 330 00 34 факс: (383) 330 00 35 E-mail: office-nsk@zeiss.ru; 620 028, **Екатеринбург**, ул. Татищева, 98, оф. 14 Тел./факс: (343) 251 52 62 E-mail: office_ural@zeiss.ru; 04070, **Киев**, ул. Ильинская, 14/6 тел.: +38 (044) 581 29 00 факс: +38 (044) 581 29 02 e-mail: office@zeiss.ua; 050 008, **Алматы**, ул. Шевченко, 146, оф.1 тел./ факс : + (727) 328-74-40 E-mail: office-kz@zeiss.ru; 700000, **Ташкент**, квартал Ц-1, 32/1а, тел.: +998 (71) 236-77-88, факс: +998 (71) 236-08-53, e-mail: info@zeiss.uz

www.zeiss.ru



We make it visible.

LSM 710 NLO/ LSM 7MP

LSM 710 NLO и LSM 7 MP идеально подходят для высокочувствительных исследований живых образцов или организмов. Обе системы отличаются непревзойденной чувствительностью. Прецизионные установки фемтосекундного лазера и максимально эффективное детектирование Non-Descanned обеспечивают качественное изображение в глубоких слоях ткани. Эксперименты по фотоотбеливанию и манипуляции можно проводить с очень большой точностью благодаря заданной 3D зоне возбуждения.

Превосходство в чувствительности



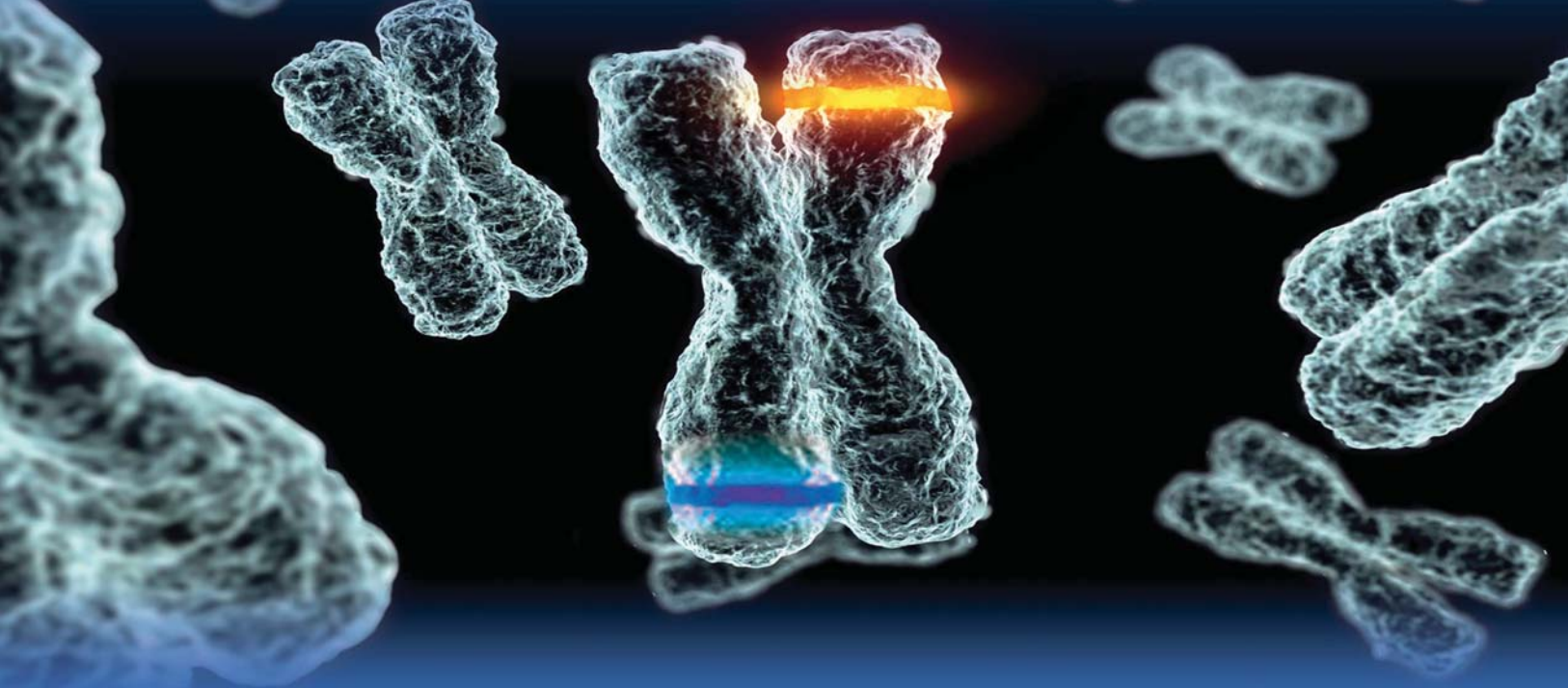
Carl Zeiss
в России и СНГ

105 005, **Москва**, Денисовский пер., 26 тел.: (495) 933 51 51 тел.: 8 800 2000 567, факс: (495) 933 51 55
E-mail: office@zeiss.ru; 197 022, **Санкт-Петербург**, ул. Академика Павлова, 5, литер «Е» тел.: (812) 702 08 11 факс: (812) 702 08 12 E-mail: office-spb@zeiss.ru; 630 058, **Новосибирск**, ул. Русская, 41/1, к.4 тел.: (383) 330 00 34 факс: (383) 330 00 35 E-mail: office-nsk@zeiss.ru; 620 028, **Екатеринбург**, ул. Татищева, 98, оф. 14 Тел./факс: (343) 251 52 62 E-mail: office_ural@zeiss.ru; 04070, **Киев**, ул. Ильинская, 14/6 тел.: +38 (044) 581 29 00 факс: +38 (044) 581 29 02 e-mail: office@zeiss.ua; 050 008, **Алматы**, ул. Шевченко, 146, оф.1 тел./ факс : + (727) 328-74-40 E-mail: office-kz@zeiss.ru; 700000, **Ташкент**, квартал Ц-1, 32/1а, тел.: +998 (71) 236-77-88, факс: +988 (71) 236-08-53, e-mail: info@zeiss.uz

www.zeiss.ru



We make it visible.



ZEISS EVO®

EVO® серия сканирующих электронных микроскопов от Zeiss - идеальное решение для исследований в биологии и медицине, а также для анализа материалов. Сверхвысокое разрешение, универсальность, работоспособность, легкость в управлении - полностью оптимизированные микроскопы для достижения наивысших результатов



Carl Zeiss SMT
Enabling the Nano-Age World®

105005, Москва
Денисовский пер., 26,
Тел.: +7 (495) 933-51-51
+7 (495) 933-51-56
Факс: +7 (495) 933-51-55,
office@zeiss.ru
www.zeiss.ru
Горячая линия: 8-800-2000-567



We make it visible.



ABOVE & BEYOND



ABOVE & BEYOND THE EXTRAORDINARY.

THE HIGHEST PERFORMING LC/MS/MS TOOLS TO ACCELERATE YOUR LAB.

As the leader in mass spectrometry for nearly thirty years, AB SCIEX has never stopped striving to create the best products available, period. We're continuing that tradition of leadership with our new, built-from-the-ground-up mass spectrometry platform for both our triple quadrupole and QTRAP® high-performance systems. Our LC/MS/MS systems are the standard in pharmaceutical and other applications where accurate and precise quantitation is critical. Scientists worldwide trust us to provide optimum productivity in qualitative and quantitative applications ranging from pharmaceutical and biomarker analysis, to food, forensics, clinical research, and environmental analysis.

AB SCIEX – we're not only setting a new standard – we're going above and beyond.

For more information visit: www.appliedbiosystems.com/5500



For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies is a joint venture between Applied Biosystems and MDS Inc. AB (Design) and Applied Biosystems are registered trademarks of Applied Biosystems or its subsidiaries in the US and/or certain other countries. QTRAP is a registered trademark and AB SCIEX Triple Quad is a trademark of Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies. © 2008 Applied Biosystems and MDS Inc., Joint Owners. All rights reserved.

МИРОВОЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА В ОБЛАСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Компания **Applied Biosystems** с более чем 25-летней историей является мировым лидером в производстве самого современного оборудования и реагентов для анализа ДНК и РНК. Оборудование компании для ПЦР, ПЦР в реальном времени, секвенирования и фрагментного анализа широко применяется для диагностики вирусных и бактериальных инфекций, наследственных и онкологических заболеваний, для HLA-генотипирования, в судебной медицине для определения отцовства и идентификации личности, в эпидемиологии, генетике, биотехнологии (генетически модифицированная продукция)



Генетические анализаторы ABI 310 / 3500 / 3500XL / 3730 / 3730XL

Линейка генетических анализаторов **Applied Biosystems** предлагает полную автоматизацию секвенирования и генотипирования как для небольших лабораторий, так и для крупных секвенирующих центров. Благодаря использованию различных длин капилляров и видов полимера возможна оптимальная конфигурация для любого типа анализа – от детекции SNP в мультиплексном режиме до полного секвенирования протяженных фрагментов ДНК. Методом капиллярного электрофореза на генетических анализаторах моделей **ABI 310**, **ABI 3500/3500XL** осуществляют обследование на хромосомные aberrации, поиск новых мутаций и групп мутаций, анализ метилированных фрагментов генома в онкологии, HLA-типирование высокого разрешения. Современные алгоритмы обработки результатов реализованы в виде готовых решений для анализа и сравнения последовательностей, ведения баз данных, генотипирования организмов. Оборудование комплектуется всеми необходимыми реагентами и расходными материалами.

С 2007 года компанией производится система полногеномного секвенирования **SOLiD™**, наиболее совершенная на сегодняшний день система для твердофазного секвенирования, основанная на новейших методах молекулярной биологии – эмульсионной ПЦР и твердофазном лигировании



ПЦР в "реальном времени"

**ABI 7300 / 7500 /
7500Fast / 7900HT**

Наряду с оборудованием и реагентами для "классической" ПЦР **Applied Biosystems** представляет готовые решения для ПЦР "в реальном времени", позволяющие максимально точно осуществлять количественную детекцию искомой последовательности ДНК. Метод позволяет одновременно детектировать несколько последовательностей в одном образце (мультиплексная ПЦР на приборах **ABI 7300/7500** и **StepOnePlus™**), а современное оборудование и реагенты для ПЦР в реальном времени позволяют проводить высокопроизводительный анализ экспрессии на проточных панелях (**TaqMan® Low Density Array**), наиболее совершенных аналогах биочипов, анализируемых на термоциклерах **ABI 7900HT**. Количественный анализ экспрессии единичных генов или генотипирование SNP методом ПЦР в реальном времени проводится на всех моделях приборов ABI с использованием наборов **TaqMan® Gene Expression Assay** (более 800,000 наборов для 9 видов организмов) / **SNP Genotyping Assay** (более 4,5 млн наборов на SNP человека и мыши).

Компания **Applied Biosystems** предлагает готовые решения для анализа ДНК и РНК: комплексные наборы оборудования, реагентов и программного обеспечения для выделения, пробоподготовки, анализа и обработки данных.

Для выделения ДНК и РНК из объектов анализа представлены полуавтоматическая станция выделения **ABI 6100** (для ДНК и РНК из цельной крови, тканей и других объектов исследования), а также реагенты для максимально быстрого "ручного" выделения НК из любых образцов.

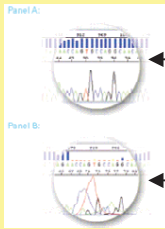
С 2005 года в состав корпорации вошла РНК-компания **Ambion**, которая представляет полный спектр реагентов и наборов по выделению, обратной транскрипции, амплификации, исследования РНК, микро-РНК, siРНК в любых организмах и типах образцов.

Адрес Московского представительства: РОССИЯ 117485, Москва, ул.Обручева, 30/1
тел.: (495) 651 67 97 факс: (495) 651 67 99 <http://www.appliedbiosystems.com>



BigDye® XTerminator™ Purification Kit
 Новый набор для очистки продуктов сиквенсовой реакции от невстроившихся терминаторных нуклеотидов

- Реакция очистки не требует многократной смены пробирок как в случае осаждения этанолом
- Полная элиминация невстроившихся терминаторных нуклеотидов
- Стабилизация образцов
- Улучшение результатов сиквенса
- Возможность автоматизации
- Высокая степень скорости, надёжности и воспроизводимости
- Процесс очистки занимает не более 40 мин и требует не более 10 мин «ручной» работы

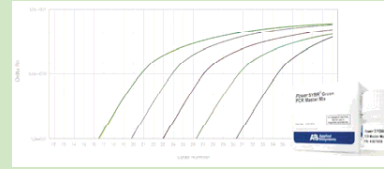


Очистка с использованием **BigDye® XTerminator™**

Появление «провала» в сиквенсе в результате плохо оптимизированной процедуры очистки

BigDye® XTerminator™ связывает невстроившиеся терминаторы, соли и другие заряженные ионы, которые могут повлиять на качество сиквенса или на эффективность электрокинетической инъекции.

Новая Реакционная Смесь для проведения ПЦР в Реальном Времени
Power SYBR® Green PCR Master Mix и набор **Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 2-Step**



Power SYBR Green PCR Master Mix позволяет осуществлять высокочувствительный количественный анализ ДНК, кДНК и РНК, сильный флуоресцентный сигнал даёт возможность детектировать 2 копии гена-мишени в широком диапазоне концентраций матрицы. Повышенная чувствительность **PowerSYBR® Green PCR Master Mix** достигается благодаря использованию **AmpliAq Gold® LD** ДНК-полимеразы высокой чистоты в новой оптимизированной реакционной смеси. Смесь **dUTP/dTTP** делает возможным добавление урацил-ДНК-гликозилазы, тем самым позволяет избавиться от контаминации. Набор **Power SYBR Green RNA-to-CT 2-Step** разработан для количественного анализа РНК, состоит из наборов **High Capacity RNA-to-cDNA** и **Power SYBR Green PCR Master Mix**. Набор **High Capacity RNA-to-cDNA kit** используется для обратной транскрипции РНК в кДНК, после чего полученная кДНК оценивается при помощи реакционной смеси **Power SYBR Green PCR Master Mix** и ПЦР с детекцией в режиме реального времени.



Applied Biosystems предлагает целую линейку наборов для выделения, очистки и стабилизации нуклеиновых кислот.

RecoverAll™ - выделение ДНК/РНК из парафинизированных и фиксированных формалином образцов тканей

MELT™ - выделение НК из тканей без предварительной гомогенизации образцов: ткань полностью растворяется в буфере, при этом РНК сохраняет стабильность при комнатной температуре больше суток.

BloodPrep® - выделение ДНК из крови за 30 мин из 96 образцов

mirVana™ - эффективное выделение низкокопийных и/или малых РНК (microRNA, siRNA, snRNA и т.п.)

mirVana™ PARIS™ - одновременное выделение из образца белков и всех типов РНК, в том числе малых и низкокопийных

DNAClear™ - очистка фрагментов ДНК после ПЦР и других ферментативных реакций

RNAlater® - особый раствор, позволяющий транспортировать ткани и клетки без заморозки в жидком азоте; РНК, содержащаяся в образцах, остается стабильной при комнатной температуре, допускается хранение образцов при





ПРЕВОСХОДЯ ДОСТИГНУТОЕ



ПРЕВОСХОДЯ ДОСТИГНУТОЕ СОВЕРШЕНСТВО

ВЫСОЧАЙШИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СИСТЕМЫ LC/MS/MS - ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ / МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ УСКОРЕНИЯ РАБОТЫ ВАШЕЙ ЛАБОРАТОРИИ.

Являясь лидером в области масс-спектрометрии на протяжении 30 лет, компания AB SCIEX никогда не останавливалась в своём стремлении создавать самое лучшее оборудование для Вас. И сейчас мы продолжаем эту традицию лидерства, представляя Вам нашу новейшую, абсолютно инновационную платформу масс-спектрометрии, совместимую с обеими нашими высокоэффективными системами – трёхквadrупольной системой и системой QTRAP®. Наши системы LC/MS/MS – это стандарт в фармацевтике и других сферах, где тщательный и точный количественный анализ критически важен. Учёные всего мира доверяют нашему опыту создания самых эффективных приборов для качественного и количественного анализа в различных областях – от фармацевтики и биомаркерных исследований до пищевой промышленности, криминалистики, клинических исследований и экологических экспертиз. AB SCIEX: мы не только устанавливаем новые стандарты – мы раздвигаем их пределы.

Для получения дополнительной информации посетите веб-сайт: www.appliedbiosystems.com/5500



Для получения дополнительной информации посетите веб-сайт www.appliedbiosystems.com/5500 или обратитесь в московское представительство компании Applied Biosystems International Inc. по адресу: 117485, Москва, ул. Обручева, д.30/1, стр.2, 7-й этаж. Тел.: +7 495 651 6797, Факс: + 7 495 651 6799.

Только для исследований. Не использовать для медицинской диагностики. Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies является совместным предприятием компаний Applied Biosystems и MDS Inc. AB (Design) и Applied Biosystems являются зарегистрированными торговыми марками компании Applied Biosystems или её дочерних предприятий в США и/или в некоторых других странах. QTRAP является зарегистрированной торговой маркой, а AB SCIEX Triple Quad - торговой маркой компаний Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies. © Applied Biosystems и MDS Inc., совладельцы, 2008. Все права защищены.

Геномика и персонализированная медицина

Молекулярная генетика *Mycobacterium tuberculosis* в Сибири и на Дальнем Востоке РФ

Филипенко М.Л.¹, Дымова М.А.¹, Киншт В.Н.²

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
² *Новосибирский НИИ туберкулеза Росздрав, Новосибирск*

Данная работа была выполнена на выборке, состоящей из 438 клинических образцов *M. tuberculosis*. Клинические образцы были получены в период с 2005 по 2007 г. из Тывы (57), Сахалина (30), г. Красноярска (49), г. Иркутска (53), г. Томска (50), г. Астаны (Казахстан) (46), г. Владивостока (104), г.Новосибирска (49). Нами изучен спектр мутаций в генах *groB*, *katG*, *InhA*, *ahpC*, *embB*, *embC*, *embF*, *gpS12*, *gpn*, *рncA*, определяющих устойчивость микобактерий к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, стрептомицину и пиразинамиду. Генетическое разнообразие изолятов циркулирующих на исследуемой территории, осуществляли с использованием 15 MIRU-VNTR типирования и разработанного нами делеционного анализа с помощью real-time PCR (RD105, RD149, RD152, RD174, RD181, RD207, RD239, RD702, RD711, RD724, RD750, mt1799, MT1802).

Доминирующими семействами являлись Beijing, Haarlem, LAM. В то же время нами обнаружено и охарактеризовано новое семейство (50 изолятов) *Mycobacterium tuberculosis*, обладающее высоким коэффициентом отличий от вышеописанных семейств и характерное для РФ. Обнаружены статистически значимые зависимости спектра и частоты мутаций, обуславливающих лекарственную устойчивость микобактерий от их генотипа.

Распространенность аллельных вариантов генов интерлейкинов и их рецепторов в этнотерриториальных группах Сибири

Бабушкина Н.П., Брагина Е.Ю., Рудко А.А., Кучер А.Н.

НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск

Изучена распространенность аллелей генов *IL4* (rs2243291), *IL4RA* (rs1801275, rs2074570), *IL12A* (rs568408), *IL12B* (rs3212227, rs3212220), *IL12RB1* (rs3746190, rs11575926) в четырех этнических группах Сибири (пришлое европеоидное население – русские, коренное монголоидное – якуты, тувинцы, буряты).

Статистически значимых различий по генетической структуре не выявлено между бурятами и якутами. Вклад в тотальную генетическую изменчивость, определяемый межпопуляционными различиями, равен 3,7%. В ряде случаев наблюдались расово-специфические различия по распространенности аллельных вариантов, а именно регистрировались следующие частоты аллелей у русских, якутов, тувинцев и бурят соответственно: аллель G в гене *IL4* (rs2243291) – 0,729, 0,412, 0,521 и 0,448; аллель A гена *IL12RB1* (rs11575926) – 0,177, 0,026, 0,042 и 0,016; аллель G в гене *IL12B* (rs3212220) – 0,797, 0,635, 0,615 и 0,588; аллель A в гене *IL4RA* (rs2074570) – 0,958, 0,828, 0,891 и 0,896. Для двух SNP (в генах *IL12RB1* и *IL12B*) показано этноспецифическое распределение частот аллелей. Наименьшая встречаемость аллеля C (rs3746190) в гене *IL12RB1* определяется у тувинцев (0,505), средние значения - у русских (0,635) и якутов (0,656) и максимальная величина зарегистрирована у бурят (0,750). Близкие оценки частот встречаемости аллеля A (rs3212227) в гене *IL12B* выявляются у тувинцев (0,641) и бурят (0,620), его частота у якутов составляет 0,714, у русских – 0,813. Для двух локусов не характерна этническая специфичность распределения частот: аллель G (rs568408) в гене *IL12A* выявлялся с частотой 0,776 у русских, 0,828 – у якутов, 0,708 – у тувинцев, 0,802 – у бурят; аллель A (rs1801275) в гене *IL4RA* – с частотами 0,865, 0,776, 0,792, 0,823 в указанных этнических группах соответственно.

Таким образом, из восьми изученных локусов для четырех можно отметить расовые различия, для двух – этническую специфичность в распространенности аллелей. Для большинства SNP имеются специфические этнические особенности в наблюдаемом распределении генотипов. Полученные результаты еще раз свидетельствуют о высокой генетической гетерогенности этнических групп Сибирского региона, что важно учитывать при планировании генетико-эпидемиологических исследований широко распространенных заболеваний.

Исследование ассоциации аллельного полиморфизма второго интрона гена *fgfr2* с риском развития рака молочной железы в Западно-Сибирском регионе России

Боярских У.А.¹, Билтуева Ю.Н.¹, Петрова В.Д.², Селезнева И.А.², Синкина Т.В.²,
Димитриади Ю.Н.², Зарубина Н.А.², Терехова С.А.² Лазарев А.Ф.², Филипенко М.Л.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск.*

² *Алтайский филиал Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул*

В 2007 г. были опубликованы результаты двух независимых исследований, в которых, на основании данных полногеномного скрининга было показано, что полиморфизм интрона 2 гена *FGFR2* ассоциирован с риском заболевания раком молочной железы (PMЖ) в европейской и азиатской популяциях. Среди наиболее сильно ассоциированных SNP оказались rs2981582 и rs7895676, расположенные в блоке неравновесия по сцеплению в интроне 2. Статистическое моделирование позволило предположить, что наиболее вероятно вариант rs7895676 обуславливает найденную ассоциацию в исследуемом регионе.

В настоящей работе мы исследовали ассоциацию семи SNP, локализованных в интроне 2 гена *FGFR2*, включая rs2981582 and rs7895676 с риском развития рака молочной железы в Западно-Сибирском регионе России, используя образцы ДНК, полученных от пациентов со sporadic формой рака молочной железы (766 чел.) и в контрольной группе (665 чел.). В исследуемой популяции аллельные частоты SNP и степень неравновесия по сцеплению отличались от таковых наблюдаемых в европейской и азиатской популяциях. Три SNP были статистически значимо ассоциированы с PMЖ: rs7895676[C] (OR = 1.28 [1.12-1.43], $p = 1.7 \times 10^{-3}$), rs2981582[T] (OR = 1.46 [1.30-1.62], $p = 2 \times 10^{-6}$) и rs3135718[G] (OR = 1.43 [1.27-1.58], $p = 6 \times 10^{-6}$). Последние два SNP имели сильное ($r^2 = 0.95$) неравновесие по сцеплению. Применение критерия отношения правдоподобия показало, что модель включающая только rs7895676, объясняет ассоциацию значительно ($p < 0.001$) хуже чем, любая из моделей, включающих или rs2981582 или rs3135718. Таким образом, в дополнение к подтверждению наличия ассоциации полиморфизма гена *FGFR2c* PMЖ в новой популяции мы можем предположить, что SNP rs7895676 вряд ли является «причинным» полиморфным вариантом.

Нами обнаружены статистически значимые отличия соотношений аллелей полиморфных маркеров, локализованных в 1-м и 6-м экзонах, в образцах кДНК, выделенных из тканей молочной железы, по сравнению с «нормальным» соотношением в образцах геномной ДНК. Это свидетельствует в пользу предполагаемого влияния полиморфизма интрона 2 гена *FGFR2* на уровень транскрипции гена.

Исследование ассоциации полиморфных вариантов генов ферментов детоксикации ксенобиотиков и рака молочной железы

Ермоленко Н.А.¹, Зарубина Н.А.², Селезнева И.А.², Синкина Т.В.², Терехова С.А.²,
Сушко А.Г.¹, Лазарев А.Ф.², Петрова В.Д.², Филипенко М.Л.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
² *Алтайский филиал Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул*

Рак молочной железы является самой распространенной причиной смертности от онкологических заболеваний у женщин. Нарушения в работе ферментов, участвующих в детоксикации канцерогенных веществ, и ферментов, участвующих в обмене реактивных производных кислорода, могут потенциально увеличивать риск возникновения раковых клеток. В физиологических условиях реактивные производные кислорода удаляются антиоксидантными ферментами – супероксиддисмутазами (SODs), каталазой (CAT) и глутатионпероксидазами (GPXs). Полиморфные варианты генов, влияющие на энзиматическую активность ферментов, могут изменять риск развития онкологических заболеваний.

Цель: исследование распространенности полиморфных вариантов генов ферментов детоксикации ксенобиотиков глутатион-S-трансфераз M1, P1, T1 (GSTM1(del), GSTP1(rs1695), GSTT1(del)) и генов ферментов антиоксидантной защиты (MnSOD(rs4880) и GPX1(rs1050450)) среди жительниц Алтайского края, больных раком молочной железы.

Материалы и методы: ДНК была выделена из крови 960 женщин, больных раком молочной железы, и 480 женщин без онкологических заболеваний в анамнезе. Для генотипирования использовался метод полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием TagMan зондов (GSTP1, MnSOD, GPX1) или интеркалирующего красителя SYBRGreen (GSTM1, GSTT1). Достоверность различий между группами по частотам генотипов и оценивали с помощью критерия χ^2 .

Результаты: Частоты встречаемости генотипов всех рассматриваемых генов в исследуемой и контрольной группах соответствовали равновесию Харди-Вайнберга. Полученные нами частоты встречаемости аллелей исследуемых полиморфных локусов в контрольной группе не отличались от таковых у представителей европеоидной расы.

Было показано, что носительство аллеля T (rs1050450) гена GPX1 является протективным в отношении спорадического рака молочной железы (OR=0.74 (95% CI .0.58-0.94), p=0.012).

Нами не было обнаружено значимых ассоциаций полиморфных локусов GSTM1(del), GSTP1 (rs1695), GSTT1(del) и MnSOD(rs4880) с увеличением риска развития семейного или спорадического рака молочной железы.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов фолатного цикла с предрасположенностью к развитию рака молочной железы в Западно-Сибирском регионе России

Вайнер А.С.^{1,2}, Воронина Е.Н.², Боярских У.А.², Зарубина Н.А.³, Филипенко М.Л.²

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

³ Алтайский филиал Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул

Метаболизм фолатов является важным звеном клеточного метаболизма: производные фолиевой кислоты поставляют одноуглеродные фрагменты для таких жизненно важных процессов, как регенерация метионина, превращение dUMP в dTMP, биосинтез пуриновых нуклеотидов, метилирование ДНК. Гены фолатного цикла могут быть рассмотрены в качестве генов-кандидатов развития онкологических заболеваний, поскольку недостаточное метилирование ДНК может приводить к инактивации протоонкогенов и нарушению хромосомной сегрегации, а подавление синтеза тимидилата – к ошибочной встройке dUMP и повреждению ДНК.

Целью нашей работы являлось изучение роли аллельных вариантов генов фолатного цикла C677T и A1298C гена MTHFR, A66G гена MTRR, G1258A гена MTHFD, T833C/844INS68 гена CBS и A2756G гена MTR в формировании предрасположенности к развитию рака молочной железы.

Определение полиморфных вариантов генов MTHFD и CBS проводилось методом ПЦР-ПДРФ анализа, а генов MTHFR, MTRR и MTR – методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфной последовательности ДНК. В выборку женщин со sporadic формой рака молочной железы было включено 670 больных в возрасте от 45 лет (средний возраст – 56 ± 8 лет). Контрольная группа состояла из 480 женщин (средний возраст – 54 ± 13), случайно выбранных из списка доноров крови и не имеющих рака молочной железы. Все женщины принадлежали к европеоидной расе русской этнической группы и проживали на территории Алтайского края РФ.

И в контрольной, и в экспериментальной группах распределение генотипов для всех исследуемых полиморфных локусов соответствовало распределению Харди-Вайнберга. Нами не было выявлено статистически значимых различий частоты встречаемости аллелей или генотипов полиморфных локусов исследуемых генов между контрольной и экспериментальной группами. Полученные нами результаты могут говорить о том, что данные полиморфизмы не оказывают влияние на развитие рака молочной железы в Западно-Сибирском регионе России.

Инновационное решение для ресеквенирования человеческого генома и экзома – геномный секвенатор GS FLX от Roche/454 Life Sciences

Грачева М.А.

ЗАО «Рош-Москва», Москва

Одним из основополагающих шагов к персонализированной медицине является ресеквенирование человеческого генома или экзома, представляющего совокупность всех экзонов геномной ДНК. Ресеквенирование позволяет обнаруживать функциональные вариации, ответственные за различные заболевания, за их индивидуальные проявления и проявления в различных популяциях, а также за устойчивость к лекарственной терапии.

Задачи ресеквенирования могут быть решены с наименьшими затратами и наибольшей эффективностью при помощи уникального высокопроизводительного секвенатора нового поколения GS FLX от компании Roche 454 Life Sciences. В основе работы этой системы лежит технология пиросеквенирования «454 Sequencing».

Система GS FLX позволяет с высокой точностью считывать около 500 миллионов нуклеотидов за одну постановку, длительностью всего 9 часов, а также анализировать полученные данные – собирать *de novo* целые геномы и транскриптомы; производить картирование ресеквенированных геномов относительно референсных геномов; анализировать ампликоны. Геномное секвенирование проводится после фрагментации геномной ДНК и создания ее библиотеки. GS FLX одновременно читает последовательности более чем одного миллиона фрагментов из библиотеки ДНК, а длина одного прочтения составляет порядка 400 нуклеотидов. Такие длинные прочтения позволяют с максимальной точностью собрать полную последовательность и детектировать различные структурные вариации, SNP, делеции, вставки и т.д.

Прорывом в секвенировании индивидуальных экзонов, которое ранее было практически невозможно, стало объединение технологии Roche 454 Life Sciences и революционной технологии Roche NimbleGen. Технология NimbleGen заключается в использовании специального ДНК-чипа для выделения всех экзонов человеческой геномной (экзома). Выделенный при помощи всего одного ДНК-чипа, индивидуальный экзон может быть полностью ресеквенирован в системе GS FLX всего за один запуск прибора.

Таким образом, Roche предлагает инновационные решения для исследования человеческого генома, которые значительно увеличивают скорость и снижают стоимость определения последовательности ДНК. В будущем эти технологии позволят максимально понять любую информацию, которую несет геном, и развить стратегии персонализированной медицины для диагностики, предотвращения и лечения различных заболеваний.

Генотерапия и генодиагностика

Как и куда дрейфуют геномы гастровирусов

Тикунова Н.В.^{1,2}, Жираковская Е.В.^{1,2}, Тикунов А.Ю.^{1,3}, Нетесов С.В.³

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск*

³ *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

Острые кишечные инфекции (ОКИ) занимают одно из ведущих мест среди инфекционных заболеваний, уступая по частоте лишь гриппу и ОРЗ. Причиной ОКИ в основном являются гастровирусы. В эту группу входят вирусы из разных таксонов, при этом чаще всего встречаются ротавирусы, калицивирусы и астровирусы.

В результате многолетнего мониторинга патогенов, вызывающих ОКИ у детей раннего возраста г. Новосибирска, была собрана и проанализирована коллекция из более 5000 клинических образцов. В каждом образце выявлялось наличие ротавирусов А, норовирусов, астровирусов и других патогенов, вызывающих ОКИ.

Генотипирование и определение нуклеотидных последовательностей кДНК выявленных гастровирусов позволило обнаружить дрейф циркулирующих генотипов. Так, определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена, кодирующего белок капсида астровирусов, выявило различия в динамике циркуляции астровирусов разных генотипов. В течение всего периода исследования доминировали генотипы 1 и 2 астровирусов. При этом практически все астровирусы генотипа 2 обладали высококонсервативной последовательностью белка капсида, а последовательности капсидного белка астровирусов генотипа 1 образовывали кластеры в зависимости от времени выделения.

Дрейф генотипов ротавирусов имел более сложные особенности. В целом, в Новосибирске доминировал генотип P[8]G[1] – от 40 до 70% в разные годы. При этом наблюдалось изменение второго по встречаемости генотипа ротавирусов. Генотипы P[8]G[9] и P[8]G[3] после первых случаев выявления быстро выходили на второе место по встречаемости, а потом или опять не встречались вообще, или встречались лишь в единичных образцах. При этом в зависимости от генотипа ряд последовательностей капсидных белков образовывал кластеры в зависимости от типа другого капсидного белка, с которым они ассоциировались. Последовательности белков других генотипов образовывали кластеры в зависимости от времени выделения или, наоборот, практически не изменялись на протяжении всего исследования. Кроме того, дрейф генотипов ротавирусов в Новосибирске отличался от такового в Омске.

Молекулярная эпидемиология и генодиагностика фенилкетонурии в регионах России

Бреннер Е.В.¹, Батурина О.А., Морозов И.В.

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

Фенилкетонурия – распространенное наследственное заболевание, к которому может привести более 500 мутаций гена фенилаланингидроксилазы. Спектры мутаций этого гена значительно различаются в разных популяциях. Успешность лечения фенилкетонурии полностью определяется своевременностью ее диагностики и генотипом по локусу фенилаланингидроксилазы в каждом случае заболевания.

Целью работы являлось исследование спектра мутаций гена фенилаланингидроксилазы, обуславливающих фенилкетонурию в Новосибирской, Кемеровской, Саратовской областях, Алтайском крае, Приморском крае и Республике Саха (Якутия), а также исследование сцепления этих мутаций с гаплотипами этого гена. В цели работы дополнительно входила разработка простых и достоверных методов идентификации мутаций.

Исследовался генетический материал больных и членов их семей с диагнозами «фенилкетонурия» и «гиперфенилаланинемия». Анализируемая выборка составила 385 человек из 129 неродственных семей. Идентификацию мутаций проводили методом секвенирования. Идентификацию гаплотипов локуса фенилаланингидроксилазы, на основе STR и VNTR повторов этого гена, осуществляли методом фрагментного анализа на автоматических генных анализаторах.

Было идентифицировано 27 типов мутаций, обуславливающих фенилкетонурию в указанных регионах России, и определено сцепление мутаций с гаплотипами локуса фенилаланингидроксилазы. Показано, что на формирование спектра мутаций, обуславливающих в исследованных регионах России фенилкетонурию, в значительной мере оказали влияние потоки генов из Европы и в меньшей степени из Азии. Ряд мутаций не типичен ни для европейских, ни для азиатских стран. Показан факт рекуррентного возникновения редкой мутации Y168H гена фенилаланингидроксилазы. Были предложены экспресс-метод пренатальной диагностики фенилкетонурии с контролем отсутствия контаминации плодного биоматериала на основе гено- и гаплотипирования родителей и биоптата плодной части плаценты и метод идентификации точковых мутаций, основанный на использовании конъюгатов олигонуклеотидов с монометиловым эфиром полиэтиленгликоля в аллель-специфичной ПЦР.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», проект № 1220.

Генетические маркеры мужского бесплодия: AZF-локус Y-хромосомы и митохондриальная ДНК

Тупикин А.Е., Морозов И.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Помощь семьям в решении проблемы бесплодия является одной из важных задач современной медицины. Данная проблема возникает примерно у 15% супружеских пар во всем мире, причем в 40–50% случаев бесплодие обусловлено различными нарушениями сперматогенеза. Примерно в половине случаев причину мужского бесплодия установить не удастся. Среди причин мужского бесплодия выделяют генетические и эндокринные факторы, инфекционные и воспалительные процессы, травмы и оперативные вмешательства, а также вредные условия труда. Генетические факторы занимают особое место в ряду перечисленных причин ввиду невозможности коррекции бесплодия при помощи консервативных методов лечения.

Одним из важных и наиболее часто встречаемых генетических факторов, обуславливающих мужское бесплодие, являются микроделеции в эухроматиновом участке длинного плеча Y-хромосомы. На длинном плече Y-хромосомы локализован участок, содержащий гены, которые контролируют развитие мужских половых клеток. Данный участок был назван «фактором азооспермии» (AZF). В среднем частота встречаемости микроделеций в AZF-районе Y-хромосомы у бесплодных у мужчин составляет 15% от всех случаев.

В последнее время к известным генетическим факторам мужского бесплодия стали причислять мутации митохондриальной ДНК (мтДНК). Митохондриальный геном, как известно, кодирует ряд белков, участвующих в синтезе АТФ посредством окислительного фосфорилирования. Мутации в любом из генов, кодирующих данные белки, могут существенно повлиять на эффективность синтеза АТФ и, как следствие, отразиться на подвижности сперматозоидов. На данный момент известно несколько мутаций и делеций мтДНК, ассоциированных с бесплодием у мужчин.

Для проведения исследования мы создали банк ДНК бесплодных и фертильных мужчин, определили спектр и частоту встречаемости мутаций мтДНК и микроделеций Y-хромосомы, и попытались установить корреляцию между степенью нарушениями сперматогенеза и определенными типами мутаций и микроделеций.

Информация о наличии микроделеций AZF-района Y-хромосомы и мутаций митохондриального генома позволит врачам подобрать корректную терапию и рекомендации для успешного зачатия ребенка при помощи методов вспомогательной репродуктивной технологии.

Работа поддержана программой РАН «Фундаментальные науки — медицине».

Генная терапия флавивирусных инфекций на примере лихорадки Западного Нила

Перебоев А.В.¹, Borisevich V.³, Tsuladze G.¹, Shakhmatov M.¹, Hudman D.¹,
Казачинская Е.И.², Разумов И.А.², Святченко В.А.², Ямщиков В.А.³, Локтев В.Б.²

¹ *Division of Human Gene Therapy, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA*

² *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Новосибирск*

³ *Department of Infectious Disease Research, Southern Research Institute, Birmingham, AL, USA*

Была разработана панель из 16 гибридом, секретирующих нейтрализующие (Nt) моноклональные антитела (mAbs) к вирусу Западного Нила (ВЗН). Оценка иммунохимической и биологической активности Nt-mAbs и картирование Nt-эпитопов с использованием рекомбинантных полипептидов показала наличие не менее 13 различных Nt-эпитопов для ВЗН. Универсальные mAbs из группы I имели высокую Nt-активность против всех исследованных штаммов ВЗН и оказались перспективными для разработки иммунотерапии и генной терапии тяжелых случаев инфекции, вызванной ВЗН. С этой целью высокоактивные Nt-mAb 9E2, распознающие Nt-эпитоп между аминокислотными остатками 321 и 466 белка Е ВЗН, были использованы для создания рекомбинантных антител Fc-9E2. Рекомбинантные антитела были сконструированы путем слияния Fc района IgG1 человека и одноцепочечных Fv происходящих из мышиной гибридомы 9E2 и секретирующей Nt-mAb 9E2. Рекомбинантные антитела Fc-9E2 сохранили исходную нейтрализующую активность mAbs и эффективно нейтрализовали ВЗН. Перенос гена кодирующего ВЗН-нейтрализующие Fc-9E2 в аденовирус позволил обеспечить высокий уровень синтеза протективных антител в системах *in vitro* и *in vivo*. Было продемонстрировано, что однократная инъекция такого аденовирусного вектора не только защищает мышей от летальной инфекции ВЗН, но и эффективна для генной терапии инфекции.

Мы заключили, что генная доставка рекомбинантных нейтрализующих антител посредством аденовируса является перспективной стратегией генной терапии флавивирусных инфекций и имеет ряд преимуществ, которые включают индукцию высокого уровня антител, высокую безопасность и низкую цену продукции препарата.

Работа поддержана грантом РФФИ 09-04-00450а.

Полиамидные подложки для выявления и выделения биомолекул

Дмитриенко Е.В.^{1,3}, Пышная И.А.¹, Запорожченко И.А.¹, Филиппов Н.С.^{1,2},
Косолобов С.С.², Латышев А.В.², Пышный Д.В.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск*

³ *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

Выделение различных биомолекул или выявление их специфических взаимодействий является актуальной задачей современной науки. Поэтому представляет интерес создание искусственных материалов, способных к распознаванию и связыванию разнообразных молекул-мишеней с высокой аффинностью и специфичностью. Мы предполагаем, что одним из путей создания полимерных материалов, способных к селективным взаимодействиям с молекулой-мишенью, может быть получение молекулярных отпечатков (импринтов) различных соединений в составе полимерной матрицы.

Мы предложили новый подход к созданию полиамидных подложек с различными структурой и свойствами поверхности, в том числе способных к молекулярному распознаванию, полученных при переходе растворенного полиамида (капрона) из жидкого в твердотельное состояние.

В ходе работы проведен скрининг различных растворителей капрона и порообразующих агентов, в том числе и многокомпонентных систем растворителей, не агрессивных по отношению к биомолекулам. В качестве основного растворителя использовали моноспирты (или их сочетания), содержащие в β-положении электроноакцепторные заместители, такие как галогены, гидроксильная группа, цианогруппа, заместители на основе углеродной цепи, в том числе прерывающиеся гетероатомами. В качестве порообразующей добавки могут быть использованы полимерные молекулы или растворители, скорость испарения которых отличается от скорости испарения используемого моноспирта. Структура полимера, размер пор и свойства поверхности напрямую зависят от композиции раствора и природы добавок.

Все полученные полимеры были охарактеризованы с помощью оптической микроскопии и сканирующей электронной микроскопии, проведены количественные исследования аффинности и специфичности при распознавании и связывании низко- или высокомолекулярных объектов. Способность контролировать структуру получаемого полимера позволяет их использовать как высокочувствительные подложки для получения чипов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума РАН («МКБ», «ОФИНиН»), междисциплинарными интеграционными грантами СО РАН (№ 76, 9, 39) и ГК ФАНИ № 02.512.11.2226, 2220, 02.513.12.3010.

Типирование вируса гриппа А с помощью олигонуклеотидных микрочипов

Рябинин В.А., Максакова Г.А., Костина Е.В., Синяков А.Н.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Гибридизационные олигонуклеотидные микрочипы, позволяющие получать большой объем информации о структуре ДНК, являются перспективным направлением в современной генодиагностике. Их использование является важной ступенью в процессе проведения профилактических мероприятий и лечения заболеваний.

В представленной работе описан микрочип, позволяющий определять серотип поверхностных белков гриппа А – гемагглютинина и нейраминидазы. При расчете зондов использовалось примерно 7000 последовательностей гена нейраминидазы и около 10000 последовательностей гена гемагглютинина, взятых из базы данных GeneBank. Отбор олигонуклеотидных зондов разбивается на два этапа. Первый включает в себя отбор аминокислотных последовательностей, характерных для белка определяемого субтипа. На второй стадии проводится расчет олигонуклеотидных зондов исходя из структуры пептидов. Общее количество рассчитанных зондов составило примерно 200 для нейраминидазы и 300 для гемагглютинина. В соответствии с полученными структурами нами были синтезированы олигонуклеотиды, содержащие на 3'-конце аминоксильный линкер, которые иммобилизовали на поверхности стеклянного слайда, модифицированного фенилизотиоцианатом.

При проведении анализа первоначально нарабатывалась к-ДНК с использованием в качестве матрицы РНК вируса гриппа А. Далее получали ампликон практически полного гена нейраминидазы или гемагглютинина с одновременным введением флуоресцентной метки на основе цианиновых красителей (Cy3 или Cy5). На финальной стадии проводилась гибридизация полученного ампликона на микрочипе и анализ картины флуоресценции. По предварительным данным предложенный метод позволяет проводить типирование гриппа А с достаточно высокой степенью достоверности.

Авторы выражают благодарность Чумакову К.М. и Неверову А.А. за представленные образцы ампликонов вируса гриппа А.

Работа проведена при финансовой поддержке МНТЦ (грант № 3803).

Генетический контроль наследуемой потери слуха

Посух О.Л.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

В настоящее время идентифицировано около 40 ядерных генов (и гены мтДНК), продукты которых участвуют в сложных процессах звуковосприятия. Более 100 локусов уже известно в ассоциации с потерей слуха, и их число постоянно растет. Таким образом, уникальной особенностью наследуемой потери слуха является чрезвычайная генетическая гетерогенность («много генов – один фенотип»), что существенно затрудняет молекулярную диагностику этой патологии. Потеря слуха в качестве одного из клинических признаков присутствует в более чем 300 известных синдромах, но более часто (70–75%) встречается изолированная (несиндромальная) потеря слуха. Глухота, обусловленная генетическими факторами, выявляется у 1 из 1500–2000 новорожденных, что превышает частоты моногенных заболеваний программы неонатального скрининга (фенилкетонурия ~ 1:10 000, муковисцидоз ~ 1:3000–6000, врожденный гипотиреоз ~ 1:4000–5000 и др.).

Вклад различных генов в потерю слуха неравнозначен. В европейских странах до 50% случаев несиндромальной глухоты обусловлено мутациями гена *GJB2*, кодирующего трансмембранный белок коннексин 26 (Cx26), образующий межклеточные каналы, через которые происходит ионный обмен между соседними клетками. При дефектах Cx26 в тканях внутреннего уха не происходит восстановления гомеостаза эндолимфы улитки, необходимого для процесса звуковосприятия. Спектр и степень распространенности мажорных мутаций гена *GJB2* обусловлены этническим составом населения. Кроме того, диагностическую значимость имеют мутации и других генов (*CJB6*, *SLC26A4*, *MYO15A* и др.), экспрессирующихся в тканях внутреннего уха, и некоторые мутации мтДНК.

В полиэтничной (алтайцы, русские, казахи) выборке глухих пациентов (Республика Алтай) у 27% обследованных установлен молекулярный диагноз глухоты, обусловленной мутациями гена *GJB2* (Cx26) (24%) и *12S RNA* и *tRNASer^(UCN)* (мтДНК) (3%). В нескольких больших алтайских семьях, где генетическая этиология глухоты осталась невыясненной, планируется проведение работ по выявлению других генов, известных в ассоциации с глухотой, и картированию новых, еще не идентифицированных, генов-кандидатов «глухоты».

Учитывая широкую распространенность и генетическую гетерогенность наследственной глухоты, необходима разработка наиболее адекватных методов ее молекулярной диагностики, позволяющих выявлять широкий мутационный спектр генов, наиболее значимых в этиологии этой патологии.

Внеклеточные нуклеиновые кислоты крови как молекулярные маркеры опухолей

Рыкова Е.Ю.¹, Елистратова Е.В.¹, Скворцова Т.Э.¹, Брызгунова О.Е.¹, Тамкович С.Н.¹,
Цветовская Г.А.¹, Чикова Е.Д.¹, Добродеев А.Ю.², Завьялов А.А.², Шелестюк П.И.³,
Старииков А.В.³, Шакиель Г.⁴, Литвяков Н.В.², Власов В.В.¹,
Чердынцева Н.В.², Лактионов П.П.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *НИИ Онкологии СО РАМН, Томск*

³ *Новосибирский областной онкологический диспансер, Новосибирск*

⁴ *Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck, Lübeck, Germany*

Ранее было показано, что в плазме крови человека присутствуют внеклеточные нуклеиновые кислоты (внНК), состав и количество которых изменяются при онкологических заболеваниях. В настоящей работе определены изменения вДНК и вРНК, циркулирующих в крови, при раке легкого, желудка и молочной железы и показана их диагностическая и прогностическая значимость.

Выявлены характерные изменения количества вДНК, связанных с поверхностью клеток и находящихся в плазме крови: при раке легкого наблюдается уменьшение количества вДНК на поверхности клеток, при раке желудка возрастает концентрация вДНК в плазме. Показана взаимосвязь выявленных изменений со стадией опухолевого процесса. Полученные результаты свидетельствуют о том, что изменение концентрации вДНК в плазме и на поверхности клеток крови может служить дополнительным диагностическим фактором при выявлении опухолевого процесса и определении тяжести заболевания.

Показано, что метилированные формы генов опухолевой супрессии *p15* и *hMLH1* выявляются в суммарных вДНК крови с высокой частотой начиная с первой стадии заболевания, что свидетельствует о перспективности использования такого анализа для ранней диагностики. Обнаружено, что изменение статуса метилирования одного из трех генов *RASSF1A*, *cyclin D2* и *RARβ2* во вДНК крови с высокой точностью позволяет выявлять больных с различными опухолями молочной железы. Установлено, что увеличение копийности 18S рРНК и опухоль-ассоциированных мРНК генов *RASSF8* и *ki-67* во вРНК крови может служить дополнительным диагностическим критерием для дифференцировки доброкачественных и злокачественных опухолей молочной железы.

Работа поддержана грантами РФФИ № 06-04-49732а и 09-04-01334а, грантами СО РАН № 13 по междисциплинарному проекту и № 12, выполняемому совместно со сторонними научными организациями (2006–2011).

Использование сердечного белка, связывающего жирные кислоты (сБСЖК), для ранней диагностики острого коронарного синдрома

Челобанов Б.П.¹, Савицкая Е.Б.¹, Афиногенова Г.Н.¹, Чешенко И.О.¹,
Зырянова А.В.¹, Велиев А.С.¹, Ровных Ю.А.², Солдатов Г.С.², Велиев С.Н.¹

¹ Научно производственное объединение «БИОТЕСТ», Новосибирск

² Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск

Заболеваемость и смертность от острого инфаркта миокарда (ОИМ) стабильно занимают лидирующие позиции в Российской Федерации. Используемые в настоящее время маркеры для выявления ОИМ имеют ряд недостатков, так, миоглобин высокочувствителен, но неспецифичен, а МВ-КФК и сердечные тропонины Т и I являются поздними маркерами и имеют длительное диагностическое окно, что не позволяет использовать их для ранней диагностики. Постоянно ведется поиск новых, более эффективных средств диагностики. Одним из них может стать ИХА тест для выявления повышения уровня сердечного белка, связывающего жирные кислоты (сБСЖК) в крови. сБСЖК – это цитоплазматический низкомолекулярный белок (15 кДа), в большом количестве содержащийся в кардиомиоцитах. Данный белок осуществляет транспорт жирных кислот сквозь клеточные мембраны и играет важную роль во внутриклеточном использовании жирных кислот. При некрозе миокарда сБСЖК быстро попадает в кровоток и обладает сходной с миоглобином кинетикой, однако имеет большую специфичность вследствие максимальной концентрации сБСЖК именно в ткани миокарда. Диагностически значимое повышение уровня сБСЖК наблюдается через 1 час от начала болевого синдрома. Уровень сБСЖК в крови достигает максимальных значений через 6 ч после повреждения миокарда и возвращается к нормальному значению через 12–18 ч.

Для выявления повышения содержания сБСЖК в крови до диагностически значимого уровня нами был разработан ИХА тест, основанный на визуализации комплекса специфических антител с исследуемыми антигенами при помощи наночастиц коллоидного золота. Разработанный нами ИХА тест для выявления повышения уровня сБСЖК в крови прошел апробацию в пяти клиниках Новосибирска и четырех клиниках Красноярска. Всего было исследовано 250 пациентов с подозрением на ОИМ. Чувствительность теста составила 93,5%, специфичность 91,3%, точность метода – 92,8%. Положительная прогнозирующая ценность составила 95,7, отрицательная – 86,9.

Поиск генетических признаков, определяющих индивидуальную спортивную успешность

Морозова С.А.¹, Трофимов Д.Ю.¹, Шевкопляс Е.В.², Ребриков Д.В.¹, Тоневицкий А.Г.³

¹ Научно производственная фирма «ДНК-Технология», Москва

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

³ ФГУ Всероссийский научно-исследовательский институт физической культуры и спорта, Москва

С целью поиска признаков, определяющих индивидуальную спортивную успешность, 1417 спортсменов – представителей олимпийских сборных РФ были обследованы по 3 физиологическим, 74 биохимическим, 11 иммунологическим и 12 генетическим показателям. Для поиска взаимосвязанных признаков был разработан алгоритм выявления взаимосвязи между качественными и количественными признаками.

Анализ полученной базы данных с использованием разработанного математического аппарата выявил ряд новых взаимосвязей генетических и фенотипических признаков. Так, обнаружена взаимосвязь между уровнем сывороточного остеокальцина и полиморфизмом С341Т гена глутатион-S-трансферазы P1 (GSTP1); уровнями гемоглобина и кортизола и полиморфизмом А4889G (вариант m2) гена цитохрома P4501 A1 (CYP1A1); активностью аланинаминотрансферазы и полиморфизмом А(-9)V гена супероксиддисмутазы (Mn-SOD); уровнем тестостерона и полиморфизмом +9/-9 гена рецептора брадикинина II типа (BDKRB2); уровнем тестостерона и делеционным вариантом гена глутатион S-трансферазы тета-1 (GSTT1) и ряд других.

Для большей части выявленных взаимосвязей предложена схема их возможной реализации на биохимическом уровне.

Работа поддержана грантом Роснауки № 02.522.12.2001 и грантом Еврокомиссии FP6 #037212 (DIAGNOSIS).

**Протеомика
и применение масс-спектрометрии в медицине**

Протеомика и метаболомика хрусталика крыс Wistar и OXYS в процессе катарактогенеза

Копылова Л.В.¹, Снытникова О.А.¹, Колосова Н.Г.², Румянцева Ю.В.²,
Мещерякова И.А.², Черняк Е.И.³, Морозов С.В.³, Центалович Ю.П.¹

¹ *Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск*

² *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

³ *Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск*

Развитие катаракты связано с возрастными изменениями в организме человека. Это заболевание встречается у людей в возрасте старше 60 лет и является одной из основных причин слепоты в мире. Хрусталик на 30 % состоит из белков - кристаллинов, большая часть которых является водорастворимыми; процессы, связанные с изменением структуры белков, могут привести к помутнению хрусталика. Механизмы этих реакций до конца не изучены, предполагается, что развитие катаракты связано с пост-трансляционными модификациями кристаллинов, обусловленных окислительным стрессом.

Изменения в белках, определяющие начальные стадии помутнения хрусталика человека, сложно исследовать из-за недостаточного количества опытного материала. В исследованиях были использованы экспериментальные рано стареющие крысы OXYS, специально выведенные в Институте цитологии и генетики СО РАН. В данной работе изучен химический состав хрусталика крыс линии OXYS и линии Wistar, контрольных крыс. Показано, что в небелковых экстрактах хрусталика содержится аминокислота триптофан (TrpH) и ее метаболит кинуренин (KN). Установлена возрастная зависимость концентрации TrpH и KN в хрусталиках крыс обеих линий. При анализе белковой фракции хрусталиков масс-спектрометрическими методами были получены протеомные карты хрусталиков обеих линий. Выявлено, что существует возрастная зависимость содержания различных кристаллинов, которая может быть связана со степенью развития катаракты.

Полученные результаты позволяют более точно определить количественный состав свободных аминокислот, антиоксидантов и соотношение кристаллинов в хрусталике. Была показана строгая возрастная зависимость содержания исследуемых компонентов. Составленные протеомные карты белков хрусталика позволяют выявить часто встречающиеся модификации, которые могут являться одной из причин развития катаракты у млекопитающих.

Работа выполнена при поддержке Грантов РФФИ 08-03-00539, 07-03-00253, Гранта президента РФ № 3604.2008.3, Госконтрактов 02.512.11.2278 и 02.740.11.0262, Программы РАН № 21 «Фундаментальные науки – медицине» (№ 22), а также гранта Отделения химии и наук о материалах РАН.

The challenges of proteomics – hard- and software solutions for confident protein identification and quantitation

Kruft Volker

Applied Biosystems, Darmstadt, Germany

Recent advances in mass spectrometry enable the fast acquisition of very large proteomics data sets. An overnight run can easily accumulate tens of thousands of protein identification and quantitation results. This makes a manual control and duration of the results highly impractical. Therefore, researchers increasingly rely on software packages to view and assess the results. However, very few researchers have sufficient informatics background to fully understand the algorithms utilized by the various software packages.

We will discuss the difficulties in designing proteomics studies as well as handling such large data sets. Applications of the efficient analysis of experimental results of protein identification as well as alternative approaches to protein quantitation will be presented.

Сложные задачи в протеомике – аппаратные и программные решения для точной идентификации и количественного анализа

Круфт Ф.

Applied Biosystems, Дармштадт, Германия

Последние достижения в масс-спектрометрии позволяют получать огромное количество данных для протеомики. За один ночной цикл работы приборы могут собрать десятки тысяч количественных и идентификационных результатов анализа белков. Обработка этой информации в ручном режиме занимает много времени и становится очень непрактичной. Поэтому современные исследователи все больше и больше полагаются на программное обеспечение, позволяющее просматривать и оценивать результаты. Однако только очень немногие специалисты обладают достаточным багажом знаний для того, чтобы в полном объеме понимать алгоритмы и возможности, заложенные в различных программных пакетах.

Мы обсудим сложности, возникающие при изучении протеомики, а также при обработке большого объема данных. В докладе будут представлены эффективные методики анализа экспериментальных результатов идентификации белков, а также будут рассмотрены альтернативные подходы к их количественному анализу.

Efficient workflows for the validation and quantitation of protein and peptide biomarker candidates

Kruft V.

Applied Biosystems, Darmstadt, Germany

A large number of laboratories around the world are identifying protein and peptide biomarker candidates with proteomics approaches. However, very few of these candidates have been validated. The main reason is the unsuccessful transition from the discovery phase (non-targeted proteomics) to the validation phase (targeted proteomics). Candidates in the validation phase need to be quantitated reliably in a large number of samples with sufficient speed, reproducibility and sensitivity. Most approaches cannot achieve this in matrices as complex as serum or plasma.

The use of mTRAQ™ reagents in combination with a global standard or quantitation with isotopically coded proteotypic peptides utilizing MRM's offers the speed, sensitivity and specificity necessary for validation of the biomarker candidates in complex matrices. Several examples of published and ongoing studies will be presented.

Эффективные рабочие процессы для валидации и количественного анализа белков и кандидатов пептидных биомаркеров.

Круфт Ф.

Большое количество лабораторий во всем мире определяют протеины и кандидаты пептидных биомаркеров с точки зрения протеомики. Однако только немногие из этих кандидатов на сегодняшний день валидированы. Основная причина этого кроется в неудачном переходе от фазы исследования (нецелевая протеомика) к фазе валидации (целевая протеомика). На стадии валидации кандидаты должны быть надежным методом проанализированы в большом количестве образцов с достаточной для этого скоростью, воспроизводимостью и чувствительностью. Большинство подходов не могут обеспечить этих показателей на таких комплексных матрицах, как сыворотка или плазма.

Использование реагентов iTRAQ в сочетании с мировыми стандартами количественного анализа с изотопически закодированными прототипами пептидов, используя MRM (мониторинг множественных реакций) позволяет достичь необходимую скорость, чувствительность и специфику, необходимые для валидации кандидатов биомаркеров в сложных матрицах. В докладе будут представлены некоторые уже опубликованные примеры, а также исследования, которые еще продолжаются.

Использование жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией для определения стероидов в крови и диагностике нарушений метаболизма

Москалева Н. Е., Веденин А. Н.

ООО «Интерлаб», Москва, Россия

Биосинтез стероидных гормонов это сложный процесс, в котором холестерол трансформируется через серию реакций в широкую гамму биологически активных соединений. Генетически детерминированная блокировка одного из путей метаболизма приводит к тяжелым последствиям, основными из которых являются нарушения водно-солевого обмена и половой дифференциации. Важным параметром диагностики таких заболеваний является анализ концентраций ключевых соединений в крови, однако наиболее распространенные в настоящее время иммуноферментные методы характеризуются большим количеством перекрестных реакций.

Нами разработана методика определения в плазме крови таких стероидов как кортизол, кортизон, кортикостерон, 11 и 21-деоксикортизол, прогестерон, тестостерон, 17 и 21-гидроксипрогестерон, андростенедион, 17-гидроксипрегненолон, дигидроэпиандростерон.

Образцы сыворотки экстрагируются диэтиловым эфиром, после упаривания и растворения в подвижной фазе проба вводится в жидкостной хроматограф «Agilent 1200» оснащенный тандемным масс-спектрометрическим детектором «Agilent 6410» с источниками ионизации электроспрей или АРPI. Хроматографическое разделение проводится при помощи колонки Thermo Hypersil – Keystone HypersilODS, 5 μ m, 2.1x100mm в градиенте метанол - 2.5 мМ водный раствор формиата аммония. Для каждого целевого соединения подобраны родительский ион и дочерний ион, а также оптимизированы параметры масс-спектрометрического детектирования для достижения максимального отклика.

Разработанная методика позволяет добиться чувствительности 0.05мкг/л для тестостерона, прогестерона, андростендиона, кортикостерона, 11-дезоксикортизола и 0.5 мкг/л для кортизона, кортизола, 21-дезоксикортизола и 17-гидроксипрегненолона. Калибровочные кривые линейны до 100мкг/л, для кортизола и кортизона до 500 мкг/л.

Данная методика позволяет проводить количественное определение стероидов в плазме крови и диагностику нарушений метаболизма. Метод отличается селективностью, что позволяет использовать его в сложных диагностических случаях как подтверждающий метод анализа.

Применение жидкостной масс-спектрометрии Applied Biosystems в медицине

Сказов Р.С.

ООО «Спектроника», Москва

Компания Applied Biosystems является мировым лидером в области жидкостной масс-спектрометрии, предлагая пользователям передовые масс-спектрометры и «готовые решения» в медицинской практике. Жидкостная масс-спектрометрия все больше применяется в клинической диагностике за счет своей высокой производительности, возможности анализа термолabile соединений, отсутствия необходимости химической модификации и быстрого хроматографического разделения.

На сегодняшний момент на приборах компании АВ опубликовано множество элегантных и простых в использовании научных работ по исследованию концентрации и процессов метаболизма гормонов, широкого спектра лекарственных препаратов, качественного и количественного анализа органических и аминокислот, всего многообразия витаминов, катехоламинов, процессов гликозилирования и изучению соответствующих нарушений обмена углеводов с установлением соответствующего диагноза, метаболитов пирена в желчи, бета-блокаторов в моче, анализу цереброспинальной жидкости лошадей для установления диагноза миелоэнцефалита в ветеринарии и многое другое.

Готовые методы анализа в клинических исследованиях:

- анализ 45 аминокислот в моче, сыворотке и плазме крови;
- анализ бензодиазепинов в физиологических жидкостях;
- анализ 4 иммунодепрессантов в образцах цельной крови за 2,5 минуты;
- анализ микофеноловой кислоты, её основного метаболита (MPAG) в плазме крови
- скрининг аминокислотного профиля и ацилкарнитина для выявления у детей более 40 врождённых заболеваний нарушения обмена веществ;
- скрининг метаболитов витамина D₂ в плазме и сыворотке.

Готовые методы анализа в судебной токсикологии:

- скрининг свыше 1700 основных сильнодействующих и наркотических веществ в моче, плазме и сыворотке крови с поиском по ЖХ-МС/МС библиотеке.

Использование изотопно меченых реагентов и специализированного программного обеспечения дает возможность исследовать онко- и биомаркеры в организме человека.

На сегодняшний момент компания АВ производит гибридные масс-спектрометры с тройным квадруполом / линейной ионной ловушкой (QTRAP), гибридный квадруполь / времяпролетный масс-спектрометр (QqTOF), тандемные времяпролетные масс-спектрометры с лазерной ионизацией (TOF/TOF) и тандемные масс-спектрометры с тройным квадруполом (QqQ).

Полную информацию о продукции Applied Biosystems вы можете найти на сайтах www.appliedbiosystems.com и www.spektronika.ru

**Протеомика систем, обеспечивающих экспрессию
и стабильность генома человека**

Coordinated actions of multiple DNA damage detectors in nucleotide excision repair

Kaoru Sugasawa

*Biosignal Research Center, Organization of Advanced Science and Technology, Kobe University,
1-1 Rokkodai, Nada-ku, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan*

It is a fundamental problem for cells to efficiently detect and repair rare DNA base lesions within the large genome. In mammalian nucleotide excision repair (NER), DNA damage recognition depends on a heterotrimeric complex containing the XPC protein. The XPC complex recognizes the presence of local unwinding within duplex DNA, rather than lesions themselves, so that it provides an important molecular basis for the broad substrate specificity of NER. The UV-damaged DNA-binding protein (UV-DDB) is another damage recognition factor involved in NER, which shows remarkable affinities for UV-induced photolesions. UV-DDB physically interacts with XPC and promotes *in vivo* recruitment of the latter to UV-damaged sites of DNA. UV-DDB associates with the CUL4A ubiquitin ligase, which appears activated upon UV irradiation, thereby ubiquitinating several substrates, including XPC, DDB2 and histones. Ubiquitination of these proteins has been implicated in chromatin remodeling for NER factors to gain access to lesions as well as transfer of lesions from UV-DDB to XPC.

It has been proposed that efficient DNA substrates for NER are composed of two structural elements: disruption of canonical Watson-Crick type base pairing and modification of the DNA chemical structure. Based on this bipartite substrate discrimination theory, XPC is obviously responsible for recognition of the former, but not of the latter. Notably, although XPC well binds to some artificial DNA structures like bubbles and loops, no NER incision occurs *in vitro* unless the DNA substrates contain any aberrant chemical modification. Thus, to induce a productive NER process, the presence of damage must be verified after XPC binds to a suspicious site that has localized unwinding of DNA duplex. In the present lecture, I would like to provide biochemical evidence that this damage verification step involves the DNA strand scanning mechanism, presumably driven by the helicase activity of TFIIH. Taken together, in mammalian NER, coordinated and sequential actions of multiple damage recognition factors seem to make crucial contribution to simultaneous achievement of efficiency and accuracy of DNA damage surveillance covering the entire genome.

Факторы, определяющие субстратную специфичность ДНК-гликозилаз

Жарков Д.О.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

ДНК-гликозилазы — центральные ферменты системы эксцизионной репарации оснований ДНК, которые расщепляют *N*-гликозидную связь поврежденного дезоксирибонуклеотида и тем самым инициируют процесс репарации. У человека известно 11 ДНК-гликозилаз, у *E. coli* — 8 этих ферментов. Некоторые ДНК-гликозилазы обладают довольно широкой субстратной специфичностью: например, эндонуклеаза III *E. coli* (Nth) способна выщеплять из ДНК почти все виды окисленных пиримидиновых оснований. Специфичность других ДНК-гликозилаз может быть очень узкой: фермент MBD4 выщепляет только основания урацила из пар U:G в контексте CpG-островков.

Субстратная специфичность ДНК-гликозилаз может зависеть от многих факторов. Установление пространственной структуры многих гликозилаз позволило определить взаимодействия в активном центре фермента, критичные для узнавания поврежденного основания. В то же время стало понятно, что специфичность может определяться не только структурой михаэлисовского комплекса, но и событиями, происходящими до его образования. На примере исследованной нами субстратной и реакционной специфичности 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека (OGG1), полиморфных и фосфомиметических вариантов этого фермента, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы *E. coli* (Fpg) и ряда ее мутантных форм, а также новых ДНК-гликозилаз из *Mycobacterium tuberculosis* рассматриваются различные факторы, определяющие субстратную специфичность этих ферментов. В число этих факторов входят структура активного центра и окружающих его областей белковой глобулы, ковалентная модификация фермента, конформационные и динамические особенности ДНК-субстрата, ионная сила реакционной смеси, наличие дивалентных катионов и взаимодействие с другими ферментами репарации. Таким образом, спектр субстратов ДНК-гликозилаз при их действии в клетке может отличаться от специфичности в условиях *in vitro*, что делает необходимым разработку новых методов исследования субстратной специфичности ферментов непосредственно в живых системах.

Работа поддержана грантами Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология», № 22.14) и РФФИ (№ 08-04-00596).

NEIL гликозилазы: новые активности и регуляция

Грин И.Р., Жарков Д.О.¹

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Большинство окислительных повреждений оснований ДНК репарируется при помощи эксцизионной репарации оснований, которая инициируется ДНК-гликозилазами. У бактерий это формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза (Fpg) и эндонуклеаза VIII. Недавно открытые гомологичные им белки млекопитающих NEIL1 и NEIL2 до сих пор мало изучены, поэтому представляет интерес изучение их субстратной специфичности и механизмов регуляции активности.

Известно, что поврежденное основание 7,8-дигидро-8-оксоаденин (8-охоА) может приводить к мутациям А→G, что свидетельствует об образовании пар 8-охоА:С в ходе репликации. Ранее считалось, что в клетках млекопитающих 8-охоА репарируется ДНК-гликозилазой OGG1. Было обнаружено, что фермент NEIL1 также способен удалять его из пар 8-охоА:С. Сходство кинетики реакции, катализируемой NEIL1 и OGG1, согласуется с возможностью участия обоих ферментов в репарации пар 8-охоА:С. Был реконструирован полный цикл репарации с участием OGG1 или NEIL1, AP-эндонуклеазы, ДНК-полимеразы β и ДНК-лигазы. Инициация репарации ферментом OGG1 приводила к полному восстановлению неповрежденной ДНК, а для завершения цикла репарации в случае NEIL1 оказалась необходима полинуклеотидкиназа. Таким образом, в клетках млекопитающих могут присутствовать два пути репарации 8-охоА.

В настоящее время активно изучается роль посттрансляционной модификации белков в различных клеточных процессах, в т.ч. в репарации ДНК. Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP), одна из форм витамина B₆, модифицирует и ингибирует многие ферменты с сайтами связывания фосфатсодержащих субстратов. Было исследовано воздействие PLP на ряд ДНК-гликозилаз. Было обнаружено, что в результате модификации PLP белок NEIL2 теряет способность связывать поврежденную ДНК, что приводит к инактивации фермента. Масс-спектрометрические исследования показали, что NEIL2 ковалентно модифицируется одной молекулой PLP по остатку Lys-50 в участке, ответственном за связывание ДНК.

Было изучено воздействие ряда солей тяжелых металлов на активность белков семейства Fpg. Ингибирование фермента NEIL1 происходило за счет образования комплексов ДНК с Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, при этом фермент терял способность преимущественно связывать поврежденную ДНК. Таким образом, ингибирование активности NEIL1 ионами тяжелых металлов может быть одной из причин их комутагенности при окислительном стрессе.

Кинетический механизм взаимодействия AP-сайтов ДНК с ферментом APE1 человека в процессе эксцизионной репарации оснований

Канажевская Л.Ю., Коваль В.В., Жарков Д.О., Федорова О.С.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Репарация поврежденных оснований геномной ДНК является важнейшим механизмом защиты генетической информации. Путь эксцизионной репарации оснований (BER), ответственный за удаление однонуклеотидных повреждений, занимает важное место среди механизмов репарации ДНК в клетках эукариот. AP-эндонуклеаза 1 человека специфически связывает образующиеся на втором этапе BER апуриновые/апирииминовые сайты (AP-сайты) на ДНК и разрезает сахаро-фосфатный остов ДНК с образованием 3'-ОН и 5'-dRP. Выяснение кинетического механизма реакции, катализируемой APE1, является важным этапом разработки подходов к специфической регуляции активности этого белка *in vivo* при различных патологиях.

Метод «остановленной струи» широко применяется для исследования быстропротекающих (в миллисекундном диапазоне времени процессов). Изменение флуоресцентного сигнала от собственных флуорофоров белка и флуоресцирующих групп, встроенных в молекулу ДНК-субстрата, позволяет в режиме реального времени регистрировать конформационные переходы в молекулах фермента и ДНК и детектировать образование промежуточных продуктов реакции.

В настоящей работе для изучения конформационной динамики APE1 и ДНК-субстратов использовали собственную флуоресценцию остатков Trp белка, а также флуоресценцию аналогов гетероциклических оснований 2-аминопурина и пирроло-цитозина. В качестве субстратов для APE1 были выбраны 12-звенные дуплексы ДНК состава 5'CTCTYXCTTCC³' • 3'GAGAGCGGAAGG⁵', где X – природный AP-сайт либо его тетрагидрофурановый аналог, Y – цитидин либо 2-аминопурин. Количественный анализ кинетических кривых, полученных методом «остановленной струи», показывает, что процесс связывания и превращения специфического субстрата описывается четырехстадийным механизмом с k_{cat} около 0.2 с. Изучение предстационарной кинетики реакций для двух мутантных форм белка APE1 (Y171F и N211A) позволило выяснить роль остатков Trp-171 и Asn-211, расположенных в активном центре, в катализе. Показано, что замена N211A не влияет на эффективность связывания ДНК-субстрата, однако значительно снижает скорость каталитической стадии, тогда как снижение скорости расщепления субстратов в случае замены Trp-171 на Phe является следствием снижения сродства APE1 к поврежденной ДНК.

Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-12211 и 07-04-00191, государственным контрактом № 02.740.11.5012.

Кинетические механизмы AP-эндонуклеазы человека APE1 и ее мутантной формы APE1K98A в инцизионной репарации нуклеотидов

Тимофеева Н.А.¹, Коваль В.В.¹, Фёдорова О.С.¹
Ищенко А.А.², Сапарбаев М.²

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия*

² *Институт Гюстава Руасси, Париж, Франция*

Фермент APE1 вовлечён в альтернативный путь инцизионной репарации нуклеотидов (NIR), который протекает без участия ДНК-гликозилаз. NIR позволяет избежать образования потенциально токсичных AP-сайтов, что является определенным преимуществом этого пути репарации над эксцизионной репарацией оснований (BER).

Проанализированы конформационная динамика и кинетический механизм действия APE1 на субстрат, содержащий 5,6-дигидро-2'-дезоксигуанидин (DHU), в процессе NIR. Для этого зарегистрированы изменения интенсивности флуоресценции 2-аминопурина, находившегося в двух разных положениях субстрата. Показано, что ~100% молекул APE1 проявляет связывающую активность. Используя [³²P]-меченый DHU-субстрат установлено, что только ~15% молекул APE1 были каталитически активны в отношении этого субстрата.

Изучено влияние замены Lys-98 на Ala (APE1K98A) на кинетические параметры действия APE1 в NIR. Как и в случае APE1 только ~15% APE1K98A проявляет каталитическую активность в отношении DHU-субстрата.

Процесс расщепления DHU-субстрата обеими формами фермента описывается одинаковыми кинетическими схемами. Лимитирующим процессом является высвобождение продукта из стабильного комплекса с ферментом.

Константа скорости каталитического расщепления DHU-субстрата ферментом APE1 в условиях NIR сопоставима по величине с константами скорости расщепления субстратов, содержащих тетрагидрофуран и AP-сайт, в условиях BER [1]. Это означает, что NIR может быть биологически значимым процессом. Показано, что каталитическое расщепление DHU-субстрата ферментом APE1K98A происходит в ~200 раз медленнее по сравнению с APE1, что свидетельствует о важной роли аминокислоты Lys=98 в катализе по механизму NIR.

1. Timofeyeva N. A., Koval V. V., Knorre D. G., Zharkov D. O., Saparbaev M. K., Ishchenko A. A., Fedorova O. S. J. *Biomol. Struct. Dyn.* 26, 637-652, 2009.

Работа поддержана грантами РФФИ (08-04-12211, 07-04-00191), СОРАН (28, 48), Министерства образования и науки РФ (NS-652.2008.4, № 02.740.11.5012).

Процессивность ферментов эксцизионной репарации оснований

Мечетин Г.В.¹, Сидоренко В.С.¹, Жарков Д.О.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

Ферменты эксцизионной репарации оснований ДНК способны быстро находить поврежденные дезоксирибонуклеотиды на фоне огромного избытка нормальной ДНК. Предполагается, что для поиска эти ферменты используют механизм одномерной диффузии, что приводит к наблюдаемому коррелированному (процессивному) расщеплению поврежденной ДНК за счет преимущественного удаления повреждений, находящихся вблизи друг от друга в одномерном контуре ДНК. Нами предложен новый метод количественного анализа коррелированного расщепления ДНК, основанный на использовании олигонуклеотидных субстратов с двумя поврежденными основаниями. С применением этого метода исследована процессивность урацил-ДНК-гликозилаз *E. coli* (Ung) и человека (UNG), 8-оксогуанин-ДНК гликозилаз *E. coli* (Fpg) и человека (OGG1), и апурин-апириимидиновых эндонуклеаз *E. coli* (Nfo) и человека (APEX1). Показано, что в той или иной мере все эти ферменты могут использовать одномерный механизм поиска; на расстояниях ~20 п.о. между повреждениями вероятность переноса молекулы фермента между ними варьировала от ~0.2 (UNG) до ~0.9 (Fpg). Процессивность ферментов уменьшалась при возрастании ионной силы раствора, а также под воздействием ионов Mg^{2+} , разрывов в одной из цепей ДНК и лигандов, связывающихся в большой или в малой бороздке ДНК между повреждениями. Процессивность действия урацил-ДНК-гликозилаз также наблюдалась в экстрактах клеток *E. coli* и человека, хотя и была ниже, чем в случае чистого фермента. Для фермента UNG человека было показано, что N-концевой домен полипептида не играет роли в процессивности. Для ферментов Fpg и OGG1 было показано, что процессивность расщепления ими «некорректных» (предмутагенных) субстратов (пары 8-оксогуанина с аденином) не отличается от расщепления «корректных» (не предмутагенных) субстратов (пары 8-оксогуанина с цитозином). Замена в ферменте Fpg остатка Phe110, который внедряется внутрь ДНК при поиске повреждения, на остатки Ala или Trp приводила к снижению процессивности. В некоторых случаях наблюдалось преимущественное выщепление только одного из двух поврежденных оснований в составе субстрата, что может свидетельствовать о модели диффузии с асимметричным отражением от одного из концов ДНК.

Работа поддержана грантами Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология», №22.14) и РФФИ (№08-04-00596).

Белки репарации ДНК: идентификация с помощью ДНК, содержащих апуриновые/апирииминовые сайты

Ходырева С.Н., Ильина Е.С., Назаркина Ж.К., Суханова М.В., Кутузов М.М., Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

ДНК постоянно подвергается повреждениям под действием экзогенных и эндогенных факторов. Ионизирующее излучение (ИИ), в том числе применяемое в терапевтических целях, вызывает широкий спектр повреждений ДНК, в репарацию которых вовлечено несколько систем. Репарация повреждений, может снижать эффективность терапии. Определение статуса некоторых белков репарации ДНК в раковых клетках может оказаться полезным в оценке эффективности терапии, связанной с повреждением ДНК. Одним из наиболее плодотворных методов в исследовании сложных ансамблей белков является их аффинная модификация химически активными ДНК, которые содержат структурные элементы, позволяющие имитировать определенные типы повреждений и/или интермедиаты определенных стадий репарации.

Один из типов таких групп – природные апуриновые/апирииминовые (АР) сайты. Остатки дезоксирибозы в АР-сайтах находятся в равновесии циклической фуранозной и ациклической альдегидной форм. Альдегидная форма образует основание Шиффа с первичными аминогруппами белков. Для поиска белков в клеточных экстрактах, проявляющих специфичность в узнавании кластерных повреждений, характерных для ИИ, были сконструированы ДНК, содержащие нунуклеотидные вставки (остатки декандиола-1,10 и диэтиленгликоля) напротив АР-сайта.

Развит подход для идентификации в экстрактах клеток белков, специфически взаимодействующих с АР-сайтами, основанный на определении белка в составе ковалентного аддукта с АР-ДНК методом пептидного картирования на основе данных MALDI-TOF-MS. С использованием этого подхода в сочетании с другими методами поли(ADP рибозо)-полимераза 1, Ku80, HMGВ1 и XRСС1 были идентифицированы в клеточных экстрактах как белки, взаимодействующие с АР-ДНК. Все указанные белки участвуют в определении радиорезистентности клеток.

Показано, что АР-ДНК могут использоваться для сравнительной оценки содержания этих белков в экстрактах клеток человека, что может явиться характеристикой радиорезистентности клеток.

Исследовано взаимодействие указанных белков с АР-ДНК и другими белками репарации ДНК. Установлена роль HMGВ1 как кофактора процесса эксцизионной репарации оснований.

Работа поддержана РФФИ (проект № 07-04-00178), программой РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ГК № 02.512.11.2247.

Взаимодействие Ku-антигена клеточных экстрактов с химически активными ДНК

Ильина Е.С., Назаркина Ж.К., Ходырева С.Н., Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Наиболее частым повреждением ДНК являются апуриновые/апиримидиновые (AP-) сайты, которые образуются как спонтанно, так и под действием ферментов. Некоторые белки, участвующие в репарации таких повреждений, образуют с ними основания Шиффа, последующее восстановление которых боргидридом натрия приводит к формированию стабильных продуктов. Этот метод может быть использован для модификации белков экстрактов, взаимодействующих с AP-сайтами. С использованием данного метода показано, что в экстрактах из клеток HeLa, K562, фибробластов человека и некоторых клеточных линий меланом образуется преимущественно один продукт модификации с кажущейся молекулярной массой около 95 кДа; по данным иммунопреципитации и MALDI-TOF-MS белок в составе продукта был идентифицирован как Ku80 субъединица Ku-антигена. Специфичность взаимодействия Ku-антигена с AP-ДНК была продемонстрирована с использованием конкурентных ДНК-дуплексов. Показана корреляция между количеством продуктов пришивки AP-ДНК к Ku80 и его содержанием в экстракте. Очищенная ДНК-зависимая протеинкиназа, в состав которой входит Ku-антиген, ингибирует расщепление AP-сайтов AP эндонуклеазой 1, являющейся основным ферментом, ответственным за расщепление AP-сайтов в клетках.

Большую сложность для клетки представляют так называемые кластерные повреждения, в которых окисленные основания, AP-сайты и разрывы цепи сгруппированы в пределах 1-2 витков спирали ДНК и могут располагаться в обеих цепях ДНК. Используемые нами ДНК-дуплексы, содержащие AP-сайт (или фотоактивный нуклеотид) и дополнительное повреждение напротив, имитируют некоторые типы кластерных повреждений и могут быть использованы для изучения взаимодействий белков клеточных экстрактов с такими ДНК. Показано, что эффективность модификации Ku80 зависит от размера и положения дополнительного повреждения в цепи напротив химически активной группы.

Фотоактивируемые ДНК-дуплексы, имитирующие интермедиаты различных путей репарации ДНК, были использованы для модификации белков клеточных экстрактов. Основные продукты с кажущимися молекулярными массами 80 кДа и 90 кДа были идентифицированы как Ku70 и Ku80 по результатам иммунопреципитации.

Работа поддержана РФФИ (проект № 07-04-00178), программой РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Кооперативные взаимодействия белков эксцизионной репарации нуклеотидов в процессе узнавания повреждений ДНК

Речкунова Н. И., Мальцева Е. А., Красикова Ю. С., Петрусева И.О., Лаврик О. И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) — один из основных путей репарации ДНК в клетках эукариот, обеспечивающий удаление из ДНК множества структурно различных повреждений, возникающих под действием УФ-излучения, канцерогенных факторов или некоторых химиотерапевтических средств. Дефекты в системе NER приводят к тяжелым заболеваниям, в том числе к некоторым формам рака. Широкая субстратная специфичность NER делает актуальным изучение механизмов узнавания поврежденных участков ДНК определенным набором белков в огромном массиве неповрежденной ДНК. Показано, что объемные фотореакционноспособные аналоги нуклеотидов, введенные в ДНК, узнаются и процессируются системой NER человека. Использование фотоактивных групп, имитирующих повреждения, позволяет ковалентно фиксировать полипептиды, находящиеся в непосредственном контакте с повреждением в ДНК. Для определения контактов факторов NER с поврежденной и неповрежденной цепями ДНК использовали ДНК-дуплексы, содержащие 5I-dUMP в различных положениях одной из цепей и в качестве повреждения — остатки флуоресцеина, присоединенные к dUMP. Исследовано взаимодействие с модельными ДНК-субстратами факторов NER — XPC-HR23В, XPA и репликативного белка А (RPA), а также их взаимное влияние в процессе узнавания повреждения. Показано стимулирующее влияние RPA и XPA на взаимодействие XPC-HR23В с поврежденной ДНК. Данные по локализации XPC-HR23В на поврежденной ДНК, полученные с помощью аффинной модификации, согласуются с данными рентгеноструктурного анализа комплекса Rad4 с фрагментом поврежденной ДНК (Min and Pavletich, 2007, Nature, 449, 570-575). RPA преимущественно взаимодействует с неповрежденной цепью ДНК-дуплекса, причем основные места контакта белка с этой цепью расположены в направлении 5'-конца. Контакты RPA и XPA с поврежденной цепью совпадают и локализованы с 5'-стороны вблизи повреждения. Полученные данные свидетельствуют в пользу модели кооперативного связывания белков, участвующих в формировании предрасщепляющего комплекса, с ДНК-дуплексами, несущими повреждения.

Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-91202-ЯФ и 09-04-00479, Программой РАН «Молекулярная и клеточная биология», Программой «Ведущие научные школы» (652.2008), ФЦПК (ГК-2009-1.1-201-018-002).

Design of Selective Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases

Ghattas M., Bryce R.A., Taberner L., Bichenkova E.V.

The University of Manchester, Manchester, UK

The protein tyrosine phosphatases (PTPs) represent a family of crucial regulatory enzymes that dephosphorylate phosphotyrosine residues in their protein substrates. PTPs are recognized as an important therapeutic target for inhibition to restore normal physiological balance as their activity is linked to various diseases, ranging from cancer to neurological disorders and diabetes. Due to the complexity of their physiological roles and the similarity in substrate specificity within the same class of Protein Phosphatases (PP), it is crucial to identify and target a specific PP involved in the disease pathway to maximise beneficial response and minimise side effects.

The main goal of this research includes development of small-molecule inhibitors of PTPs, including structure-based rational design and evaluation of biological activity of potential inhibitors of PTPs.

This research focuses on the structural aspects in designing of selective inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases and provides the basis for the further development of PTP inhibitors as potential therapeutics.

Пакет BISON и современный программный инструментарий биоинформатики для геномики и протеомики

Воробьев Ю.Н., Попов А.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Количество информации о молекулярных объектах живой клетки человека стремительно растет. Сбор, обработка и систематизация, анализ закономерностей, построение математических моделей взаимодействий между молекулярными объектами и прогнозирование взаимодействий и их развития во времени — это задачи биоинформатики. Медицинская протеомика основана на контроле протеомного статуса, который динамически меняется и отражает отклонение от нормы. Протеомный анализ и предсказание тенденции изменения протеомного статуса требуют сложного биоинформационного обеспечения. Требуемые программные средства можно разделить на два сегмента. Первый сегмент — это анализ текущего протеомного статуса, т.е. набора белков и их концентраций. Второй сегмент сфокусирован на структурно-функциональном анализе протеома и прогнозировании его функционального статуса. Полнота, качество и доступность программных средств биоинформатики чрезвычайно важны, поскольку это создает возможность массового использования методов биоинформатики рядовым экспериментатором.

Проект *Human Proteomics Initiative* Института биоинформатики Швейцарии предполагает непрерывное совершенствование программных средств и баз данных для аннотации всех известных человеческих белков, их последовательностей, функциональных особенностей, локализации в клетке, структуры и взаимодействий с другими белками и лекарственными препаратами. Раскрывается современное состояние программных средств анализа протеома: предсказание структуры белка по гомологии, структурная динамика, прогнозирование стабильности белков, взаимодействие с лигандами. Рассмотрен разработанный в ИХБФМ пакет BISON для моделирования белков: конформационной динамики, стабильности и взаимодействия с лигандами. Представлены результаты моделирования влияния мутаций на стабильность, динамику и функциональные свойства белка hOgg1 системы репарации ДНК человека.

Работа поддержана проектом РФФИ №09-04-00136 и интеграционными проектами СО РАН № 26 и № 119.

DNA polymerases β and λ as a potential participants of TLS during genomic DNA replication on the leading and lagging strands

Belousova E.A.¹, Lebedeva N.A.¹, Maga G.², Lavrik O.I.¹

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia*

²*Istituto di Genetica Molecolare, Pavia, Italy*

The main strategy used by pro- and eukaryotic cells for replication of damaged DNA is translesion synthesis (TLS). Here, we investigated TLS activity of the human X-family DNA pols beta and lambda on DNA duplexes containing different lesions resulted from the oxidative stress – abasic site, oxoguanine and thymine glycol. We determined kinetic parameters of native and photoreactive dNTP incorporation opposite different DNA damages by DNA pols activity in the presence of Mg(II) or Mn(II) ions. Additionally, we investigated the influence of hPCNA and hRPA on TLS-reaction. Further, to discriminate the surrounding proteins that could potentially act during TLS in the cell we applied the photoaffinity labelling approach for modification of Bovine Testis (BT) and HeLa (RC) extract proteins. We found a limited number of modification products among the general pool of proteins. It was confirmed: (i) by Western blotting that the RC 75–80 kDa crosslinking product is the covalent adduct of DNA to pol lambda; (ii) by immunoprecipitation with human antibodies that the BT 105 kDa crosslinking product is PARP1.

On the basis of experimental results, DNA pols beta and lambda can be proposed as a “good” candidates for participation in TLS process across AP-site, 8-oxoG and Tg during genome DNA replication on the leading and lagging strands. Moreover, DNA pols beta and lambda can be a components of TLS machine not only during the first stage of the process (i.e. incorporation of dNMP opposite damage) but on the stage of processing of uncomplementary 3'-end of primer. Both DNA pols are very attractive for construction and application of photoreactive DNA structures for studying TLS process in eukaryotic cellular/nuclear extracts.

This work was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (No. 09-04-00899-a), and program of Russian Academy of Science “Molecular and cellular biology”.

Программа РАН
«Фундаментальные науки – медицине»
Вирусы и вызываемые ими заболевания

Вирус гриппа H5N1: инфекционный процесс *in vitro* и *in vivo*

Рябчикова Е.И.¹, Таранов О.С.^{1,2}, Спицына Ю.Е.¹, Гончаренко А.К.¹,
Мазуркова Н.А.², Демина О.К.²

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
² *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск*

Высоко патогенный вирус гриппа подтипа H5N1 рассматривается в качестве возможного источника нового пандемического штамма. Задачей данной работы было изучение особенностей репродукции в различных экспериментальных системах выделенных в России штаммов A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Suzdalka/11/2005 и A/Duck/Kurgan/08/2005.

Клетки культур Vero и MDCK заражали тремя штаммами в дозах 0,1–10 БОЕ/клетку и инкубировали в течение 7–48 ч, затем фиксировали 4% ный р-ром параформальдегида. Белых беспородных мышей массой 12–15 г заражали в дозе 10 ЛД₅₀ интраназально штаммами высокой (A/Chicken/Kurgan/05/2005), средней (A/Duck/Kurgan/08/2005) и низкой вирулентности (A/Chicken/Suzdalka/11/2005) для данного вида. Ежедневно умерщвляли по 3 мыши из группы в течение 8 суток после заражения, легкие фиксировали 4% ный р-ром параформальдегида. Образцы легких и клеток обрабатывали по стандартной методике и изучали в световом Imager Z1 («Цейс», Германия) и электронном Jem 1400 («Джеол», Япония) микроскопах.

Репродукция штаммов вируса гриппа H5N1 происходила в ядрах зараженных клеток Vero и MDCK, а вирусное потомство формировалось на поверхности клеток путем почкования, которое происходило в тесной связи с липидными рафтами (кавеолами). Заражение мышей штаммами вируса гриппа H5N1 вызывало глубокие деструктивные изменения эпителия трахеи и бронхов через 24–48 ч после заражения. Репродукция всех штаммов выявлена в небольшом количестве реснитчатых клеток. Инфекция штаммом A/Chicken/Suzdalka/11/2005 сопровождалась апоптозом клеток бронхиального эпителия и отчетливой нейтрофильной реакцией. В ходе заболевания патологические изменения легких нарастали, развивались очаговые некрозы. Особого внимания заслуживают выявленные у всех мышей отчетливые патологические изменения кровеносных сосудов легких и крови, отслойка эндотелия и формирование тромбов. Полученные результаты показывают, что патологические изменения легких мышей, зараженных вирусом гриппа H5N1, прямо не связаны с размножением вируса в клетках легких и, по-видимому, являются следствием нарушения баланса цитокинов, регулирующих развитие эффекторных реакций иммунной системы.

Анализ влияния вакцинации на заболеваемость клещевым энцефалитом населения Новосибирской области

Лбов Г.С.¹, Полякова Г.Л.¹, Гусев В.А.¹, Бахвалова В.Н.², Морозова О.В.³, Лутова С.Л.⁴,
Банникова Л.М.⁵, Козловский Л.И.⁵, Михеев В.Н.⁶, Шульгина Н.И.⁶, Глупов В.В.²

¹ *Институт математики СО РАН,* ² *Институт систематики и экологии животных СО РАН,*

³ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,*

⁴ *Городская поликлиника №14,* ⁵ *ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии Новосибирской обл.,*

⁶ *Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека по Новосибирской области, Новосибирск*

Заболеваемость людей клещевым энцефалитом (КЭ) периодически изменяется и ежегодно составляет около 11 000 случаев в России. Для иммунизации населения эндемичных областей применяют 4 типа вакцин, полученных инаktivацией формалином вируса КЭ из первичных культур клеток. Для производства вакцин российские производители используют штаммы вируса КЭ дальневосточного генетического типа, а зарубежные – западноевропейские штаммы, несмотря на доминирование сибирского генетического типа вируса КЭ в большинстве регионов России.

Проведен совместный анализ данных по вакцинации, частоте укусов людей клещами и уровнях заболеваемости людей КЭ по Новосибирской области (НСО), г. Новосибирску и Советскому району с использованием методов обнаружения логических закономерностей за период с 1991 по 2008 г. Между укусами клещами и заболеваемостью людей КЭ в Советском районе обнаружена положительная зависимость (коэффициент корреляции $r=0,88$). Уровень иммунизации за последние годы повышался и в 2008 г. составлял приблизительно 4% населения НСО, соотношение отечественных (из них Энцефир 60%) и зарубежных инаktivированных вакцин для иммунизации населения Советского района с 2002 по 2008 г. было около 4:1. Максимальное количество заболевших КЭ было зарегистрировано в НСО в 1998 г., в Новосибирске и в Советском районе – в 1992 г. Между общим количеством вакцинированных и заболевших КЭ людей выявлена отрицательная корреляция: в НСО и в Новосибирске с 2005 г. ($-0,88 < r < -0,59$); в Советском районе с 1995 г. ($-0,98 < r < -0,48$). С 2005 г. отмечается стабилизация низкого уровня заболеваемости КЭ. Таким образом, иммунизация даже незначительной части населения эндемичной по КЭ НСО преимущественно отечественными инаktivированными вакцинами уменьшает уровень заболеваемости КЭ.

Работа выполнена в рамках Интеграционного гранта СО РАН (№ 83).

PolyCTLDesigner: программное обеспечение для конструирования полиэпитопных вакцин

Антонец Д.В., Максюттов А.З., Бажан С.И.

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
Новосибирск*

Дизайн полиэпитопных вакцинных конструкций, нацеленных на индукцию высокого уровня цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа, является перспективным подходом к созданию эффективных вакцин. При разработке таких иммуногенных конструкций необходимо оптимизировать процессинг и презентацию включенных в ее состав эпитопов иммунной системе организма. Для конструирования полиэпитопных антигенов, способных эффективно индуцировать цитотоксический Т-клеточный иммунный ответ, было создано программное обеспечение PolyCTLDesigner. Программа позволяет производить выбор минимального набора эпитопов, покрывающего разнообразие выбранных аллелей МНС с заданным уровнем избыточности, осуществляет подбор допустимых паросочетаний эпитопов и спейсерных последовательностей, увеличивающих эффективность протеасомного процессинга и связывания пептидов с транспортерами, ассоциированными с процессингом (TAP), позволяет минимизировать количество «нецелевых» эпитопов, образующихся в результате объединения пептидных фрагментов, и выбирает оптимальную последовательность полиэпитопного антигена. Для предсказания протеасомного и иммунопротеасомного процессинга антигенов PolyCTLDesigner использует модели, разработанные Тоузом и др. [1], а для предсказания связывания пептидов с TAP в программе используются модели и алгоритмы, созданные Петерсом и др. [2]. PolyCTLDesigner интегрирован с созданным ранее программным обеспечением TEpredict, предназначенным для предсказания Т-клеточных эпитопов. Программы TEpredict и PolyCTLDesigner, их описание и исходный код находятся на сайте проекта: <http://tepredict.sourceforge.net>.

1. Toes R.E. et al. (2001). J. Exp. Med., 194:1-12.
2. Peters B. et al. (2003). J. Immunol., 171:1741–1749.

Исключительное многообразие абзимов молока здоровых доноров и крови пациентов с аутоиммунными и вирусными заболеваниями

Невинский Г.А., Бунева В. Н.

*Институт химической и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск,
факс: (383)33367; электронная почта: nevinky@niboch.nsc.ru*

Появление в крови людей антител (АТ) с каталитическими активностями является самым ранним признаком сбоя иммунной системы и развития ряда аутоиммунных заболеваний (АИЗ). На ранних стадиях АИЗ репертуар абзимов относительно небольшой, но резко увеличивается при их развитии, а также обострениях АИЗ. В крови здоровых людей обнаружены АТ с оксидоредуктазными активностями, а в молоке здоровых рожениц также АТ, фосфорилирующие белки, липиды и полисахариды. В зависимости от типа аутоиммунного заболевания в крови людей могут быть обнаружены АТ, гидролизующие ДНК и РНК, основной белок миелина, тиреоглобулин и т.д. Все эти абзимы характеризуются исключительным многообразием по своим ферментативным характеристикам, общему заряду, зависимости от ионов различных металлов, оптимуму рН, субстратной специфичности и т.д. В данном сообщении рассматриваются новые данные о возможных причинах исключительной каталитической гетерогенности абзимов, а также возможная роль абзимов и их исключительного многообразия в патогенезе различных АИЗ.

Работа поддержана грантами Программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине (№ 12.2),» «Молекулярная и клеточная биология» (№ 10.1), а также РФФИ (№ 07-04-00387, 07-04-00395), РФФИ-БФФИ (№ 08-04-90014) и Интеграционным проектом СО РАН (№ 6).

Искусственные рибонуклеазы: новый способ инактивации РНК-содержащих вирусов и средство получения новых улучшенных вакцин для медицины и ветеринарии

Ковпак М.П., Гончарова Е.П., Сильников В.Н., Зенкова М.А., Власов В.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Возникновение высокопатогенных вирусных штаммов требует создания эффективных противовирусных препаратов. Идеальной мишенью для инактивации вируса гриппа является его геномная РНК. В предыдущих работах был описан новый способ инактивации вируса гриппа, основанный на разрушении геномной РНК вируса низкомолекулярными синтетическими молекулами, способными расщеплять фосфодиэфирные связи РНК, — искусственными рибонуклеазами (аРНКазами). Мы предположили, что такой способ инактивации РНК-содержащих вирусов можно использовать для получения инактивированных вакцин.

Ранее было разработано нескольких серий аРНКаза, включающих в себя РНК-расщепляющие группы. Эти соединения работают подобно природным рибонуклеазам и не воздействуют на другие биополимеры. аРНКаза L2-3 из серии L, представляющая собой гидрофобный линкер, фланкированный пептидоподобными структурами, эффективно расщепляет РНК вируса гриппа *in vitro* с полной сохранностью антигенных детерминант. Мы показали, что аРНКаза L2-3 эффективно инактивирует вирус гриппа *in vitro* в концентрации 1 мМ за 18 ч при 37°C.

Для того чтобы оценить возможность использования аРНКаза L2-3 в качестве инактивирующего агента, мы провели иммунизацию мышей Balb/C вирусом гриппа A/WSN/33(H1N1), инактивированным данным соединением. После двукратной иммунизации наблюдалась высокая протективная активность вируса, инактивированного L2-3, так как при заражении мышей дозой 0,5 LD₅₀ наблюдалось достоверно значимое снижение уровня репликации вируса в легких в 30 раз по сравнению с контролем. При этом титр специфических IgG антител в крови составил 1/8000—1/10000. Иммунизация на 100% защитила мышей от заражения дозой 3 LD₅₀ по сравнению с неиммунизированными мышами.

Относительно низкая токсичность и высокая противовирусная активность соединения позволяет позиционировать аРНКаза — новый класс эффективных противовирусных средств, действие которых основано на разрушении вирусного генома, — для применения в медицинской и ветеринарной практике.

Работа выполнена при поддержке программ фундаментальных исследований РАН «Молекулярная и клеточная биология», «Фундаментальные науки — медицине», РФФИ 08-04-01516-а, Междисциплинарного проекта СО РАН № 5.11.

Иммуноглобулины, гидролизующие интегразу и обратную транскриптазу ВИЧ-1

Бунева В.Н.^{1,2}, Одинцова Е.С.^{1,2}, Баранова С.В.^{1,2}, Пархоменко Т.А.^{1,2},
Сизякина Л.П.³, Невинский Г.А.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

³ *НИИ клинической иммунологии Ростовского государственного медицинского университета, Ростов-на-Дону*

Впервые в крови ВИЧ-инфицированных больных обнаружены каталитически активные иммуноглобулины с протеолитической активностью.

Показано, что препараты поликлональных IgG из крови ВИЧ-инфицированных больных содержат небольшие фракции антител, которые с высокой эффективностью гидролизуют только интегразу (ИН) или только обратную транскриптазу (ОТ) ВИЧ, но не другие белки. На основании выполнения общепринятых критериев сделано заключение, что протеолитическая активность иммуноглобулинов крови ВИЧ-инфицированных больных является их собственным свойством.

Показано, что в зависимости от пациента суммарный пул антител в случае ОТ-гидролизующей активности содержит в основном абзимы с активным центром, подобным сериновым протеазам, а в случае ИН-гидролизующей активности может содержать в различном соотношении абзимы с активными центрами, подобными тиоловым, сериновым, кислым и металлопротеазам. Показано, что при ВИЧ-инфекции образуется широкий спектр абзимов с различными ферментативными характеристиками, при этом состав спектра индивидуален для каждого пациента. Каталитические свойства антител и классических протеаз человека (сродство к субстратам, металл- и рН-зависимость, субстратная специфичность) существенно различаются.

Установлено, что иммуноглобулины ВИЧ-инфицированных больных гидролизуют интегразу в центральном и С-концевом доменах белковой молекулы.

Показано, что у ВИЧ-инфицированных пациентов относительный уровень протеолитической активности антител зависит от стадии и особенностей течения заболевания. Детекция активности абзимов может служить дополнительным критерием в оценке скорости прогрессии ВИЧ-инфекции.

Работа поддержана грантами Программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» № 21.16 и «Молекулярная и клеточная биология» № 22.7, а также РФФИ №№ 09-04-00804, 08-04-00315, 08-04-90014_Бел, Аналитической ведомственной целевой программой «Развитие научного потенциала высшей школы» № 2.1.1/5580 и Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 98.

**Программа РАН
«Фундаментальные науки – медицине»
Новые технологии в лечении онкологических
заболеваний**

Высокоэффективные анти-MDR1 siРНК

Круглова Н.С., Мещанинова М.И., Веняминаова А.Г., Зенкова М.А.,
Власов В.В., Черноловская Е.Л.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Создание высокоэффективных siРНК является актуальной задачей современной молекулярной биологии. Оптимизация дизайна дуплекса позволяет увеличить интерферирующую активность siРНК, повысить эффективность накопления их в клетках, а также усилить стабильность в присутствии рибонуклеаз.

Исследовано влияние модификации структуры дуплекса на интерферирующую активность siРНК, направленных на мРНК гена *MDR1*, содержащих 2'-О-метильные звенья в нуклеазочувствительных сайтах. Показано, что снижение термостабильности центральной части дуплекса путем введения нуклеотидных замен в одну из цепей, а также увеличение термоасимметрии дуплексов siРНК путем введения нуклеотидных замен с 3'-конца смысловой цепи способствует увеличению их интерферирующей активности. Исследование нуклеазоустойчивости термоасимметричных siРНК показало, что адресная 2'-О-метильная модификация нуклеазочувствительных сайтов эффективно защищает несовершенные дуплексы от деградации в присутствии сыворотки и существенно увеличивает длительность их ингибирующего действия.

Исследована эффективность накопления siРНК, содержащих на 5'-конце смысловой цепи различные остатки липофильной природы, в клетках человека НЕК 293, KB-8-5 и HerG2. Показано, что эффективность проникновения siРНК в клетки зависит от природы липофильного остатка и увеличивается с ростом длины линкера, связывающего siРНК и липофильный остаток. Идентифицированы siРНК, которые способны эффективно проникать в клетки при концентрациях siРНК: 0.2–5 мкМ без помощи трансфекционных реагентов.

Таким образом, путем оптимизации дизайна дуплексов siРНК получены высокоэффективные ингибиторы экспрессии гена *MDR1*, а разработанные в работе подходы могут быть использованы для создания высокоэффективных siРНК, направленных практически к любой мРНК-мишени.

Работа выполнена при финансовой поддержке программ РАН «Молекулярная и клеточная биология» № 22.1 и «Фундаментальная наука – медицине» № 21.18, междисциплинарного проекта СО РАН № 41, ФЦП 02.512.11.220 и РФФИ 08-04-01073а.

Природные нуклеазы, РНКазы А и ДНКазы I, как перспективные препараты для лечения метастатических форм рака

Миронова Н.Л.¹, Патутина О.А.¹, Рябчикова Е.И.¹, Попова Н.А.²,
Власов В.В.¹, Зенкова М.А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

Недавно полученные данные об участии миРНК и опухоль-ассоциированной ДНК в регуляции канцерогенеза дали новый толчок к изучению противоопухолевого и антиметастатического действия ферментов, способных расщеплять нуклеиновые кислоты. Существующие данные о противоопухолевом потенциале РНКазы А противоречивы: в ранних исследованиях показана ее высокая активность [1], в более поздних — ее полное отсутствие [2]. Противоопухолевый потенциал ДНКазы I пока изучен недостаточно.

В данной работе на примере двух метастазирующих опухолевых моделей — карциномы легких Льюис и гепатоме А-1 — мы впервые показали, что внутримышечное введение РНКазы А в диапазоне доз 0.5–50 мкг/кг замедляет рост первичной опухоли на 40% и значительно, до 80%, подавляет развитие метастазов, а в сочетании с ДНКазой I приводит к практически количественному подавлению развития метастазов. Была сделана попытка поиска корреляции между способностью РНКазы А и ДНКазы I расщеплять нуклеиновые кислоты и их противоопухолевой и антиметастатической активностями. Нами было установлено, что инактивированная РНКазы А вызывает слабое подавление роста первичной опухоли и, несмотря на потерю каталитической функции, ингибирует развитие метастазов с эффективностью в 1,3 раза меньшей, чем интактная РНКазы А. Инактивированная ДНКазы I также подавляет развитие метастазов, однако в 1,7 раз менее эффективно, чем интактный фермент. Полученные данные показали, что хотя каталитическая функция и вносит существенный вклад в противоопухолевую и антиметастатическую активность ферментов, наблюдаемый терапевтический эффект обусловлен и другими невыявленными механизмами действия ферментов на различные звенья канцерогенеза.

Наши данные показывают, что РНКазы А и ДНКазы I могут быть применены в качестве терапии сопровождения для лечения метастатических форм рака.

1. Ledoux L. Nature. 1955. V. 176. № 4470. P. 36–37.
2. De Lamirande G. Nature. 1961. V. 192. P. 52–54.

Работа поддержана программами РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки — медицине, грантом РФФИ 09-04-01362 и грантом Президента РФ для молодых ученых МК-309.2008.4.

Токсическое поражение печени при полихимиотерапии лекарственно-резистентного опухолевого процесса

Сенькова А.В.^{1,2}, Агеева Т.А.¹, Зенкова М.А.², Патутина О.А.²

¹ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Эффективность химиотерапии гемобластозов, с одной стороны, ограничена процессами множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), а с другой – токсическим повреждением органов, в особенности печени, где происходит биотрансформация большинства противоопухолевых препаратов с образованием токсических метаболитов.

В данном экспериментальном исследовании изучали механизмы прогрессирования МЛУ опухоли и особенности токсического поражения печени при многокурсовой полихимиотерапии (ПХТ) перевиваемой лимфосаркомы RLS₄₀, изначально проявляющей МЛУ-фенотип. В эксперименте № 1 мышам имплантировали опухоль, проводили курс ПХТ по схеме СНОР, затем производили четырехкратное перепассирование опухоли интактным животным с последующим проведением ПХТ. В эксперименте № 2 животным с перевитой опухолью проводили три непрерывных курса ПХТ с интервалом 7 дней. После каждого курса ПХТ производили забор материала для гистологического исследования, а также определяли профиль экспрессии генов методом ОТ-ПЦР.

После четырех курсов ПХТ при перепассировании опухоли уровни экспрессии генов *mdr1b*, *bcl-2* и *p53* в клетках опухоли возрастали по сравнению с интактной опухолью RLS₄₀ в 1.3, 2.3 и 1.6 раза. Трехкратное введение комплекса цитостатиков животным-опухоленосителям сопровождалось увеличением экспрессии генов *mdr1b* и *bcl-2* в 2.8 и 2.0 раза и снижением экспрессии *p53* в 2.0 раза.

При морфометрическом исследовании печени было выявлено, что проведение трех непрерывных курсов ПХТ животным-опухоленосителям сопровождалось значительными альтеративными изменениями, составлявшими 85% от всей паренхимы печени. При повышении цитостатической нагрузки на опухоль от пассажа к пассажи происходило нарастание деструктивных изменений в интактной печени: объемная плотность некрозов паренхимы на 4 пассаже опухоли возрастала на 33% по сравнению с 1 пассажем опухоли.

Таким образом, независимо от схемы селекции лекарственно-устойчивого опухолевого клона происходит прогрессирование процессов МЛУ, а нарастание лекарственной резистентности опухоли сопровождается более выраженным токсическим повреждением внутренних органов.

Программа РАН
«Фундаментальные науки — медицине»
Новые лекарственные препараты и технологии

Скрининг биологической активности производных бетулоновой кислоты с целью поиска потенциальных политаргетных препаратов-корректоров цитостатиков

Баев Д.С., Сорокина И.В., Толстикова Т.Г.

Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова, Новосибирск

В последнее время большой интерес вызывают работы, посвященные изучению агентов с широким спектром биологического действия, синтезированных на основе природных тритерпеновых платформ – олеаноловой, урсоловой и бетулиновой кислот [1].

Для этих соединений изучены механизмы действия на биологические мишени, а также фармакодинамические свойства, связанные с антиоксидантным, противоопухолевым, противовоспалительным, противовирусным и цитопротекторным действием [1, 2]. Многообразие молекулярных мишеней для этих соединений позволяет рассматривать их в качестве потенциальных высокоактивных политаргетных препаратов. Наравне с бетулиновой кислотой высокоактивно другое производное природного пентациклического тритерпеноида бетулина – бетулоновая кислота.

С помощью прогноза спектра биологической активности соединений в программе PASS осуществлен скрининг ряда новых производных бетулоновой кислоты с целью поиска эффективных политаргетных препаратов. Адекватность прогноза показана на высоком уровне корреляции прогностических данных с данными, полученными экспериментально для бетулоновой кислоты, ее эфира и амидов.

В ряду новых производных бетулоновой кислоты были выявлены соединения с потенциально высокой противоопухолевой, противовоспалительной и гепатопротекторной активностью, что позволило провести направленный экспериментальный скрининг этих производных на указанные эффекты.

В результате скрининга был выявлен новый высокоэффективный корректор цитостатиков с противоопухолевым действием, способный повышать эффективность цитостатической терапии, – производное бетулоновой кислоты 3-оксо-28-(N-метилпиперазин)-карбонил-луп-20(29)-ен.

1. Michael B. Sporn, Karen Liby, Mark M. Yore et al. Platforms and Networks in Triterpenoid Pharmacology. Drug Development Research, 2007, 68, 174–182.
2. Karen T. Liby, Mark M. Yore, Michael B. Sporn. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. Nature Reviews Cancer, 2007, 7, 357–369.

Работа выполнена в рамках интеграционных проектов СО РАН «Инновационные технологии в лечении рака» (№ 20) и «Научные основы разработки новых лекарственных препаратов. Перспективы использования возобновляемого сырья» (№ 54).

Биологическая активность новых производных глицерретовой кислоты

Логашенко Е.Б.¹, Марков А.В.¹, Саломатина О.В.², Салахутдинов Н.Ф.², Попова Н.А.³,
Каледин В.И.³, Николин В.П.³, Зенкова М.А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск
³ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Для решения проблемы лечения онкологических заболеваний необходимы новые подходы, обеспечивающие высокую избирательность и эффективность лечения, а также поиск новых противоопухолевых препаратов. Важным направлением медицинской химии является изучение синтетических аналогов природных метаболитов, о биологической активности которых имеются надежные сведения.

К настоящему моменту описан ряд тритерпеноидов растительного происхождения, обладающих иммуностимулирующими, противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами. Глицерретовая кислота (ГЛК), один из самых распространенных тритерпеноидов олеанолового ряда, содержится в корнях солодки и является одним из немногих тритерпеноидов с выраженной биологической активностью. В последние годы все большее внимание уделяется направленной модификации этих соединений, приводящей к увеличению их биологического действия.

В настоящей работе проведено исследование ряда веществ, полученных путем направленной химической модификации ГЛК. Анализ биологической активности этих соединений *in vitro* показал, что некоторые из соединений проявляют токсичность по отношению к опухолевым клеткам человека в концентрации около 10^{-6} М. Данные, полученные при изучении механизма действия этих соединений, свидетельствуют о том, что гибель опухолевых клеток протекает по пути индуцированного апоптоза. Добавление антиоксиданта глутатиона полностью ингибирует действие соединений на клетки, что позволяет сделать предположение о том, что активация апоптоза происходит через повышение уровня активированных кислородных метаболитов.

Исследование наиболее активного производного ГЛК в экспериментах *in vivo* показало, что использование препарата в дозе 10 мг/кг приводит к увеличению продолжительности жизни мышей с лимфосаркомой. В экспериментах *ex vivo* на мышинной модели опухоли молочной железы Кребс-2 продемонстрировано торможение роста опухоли на 88,2% по сравнению с контролем.

Работа поддержана программами РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки – медицине», интеграционным грантом СО РАН № 104.

Разработка новых высокоактивных психотропных средств на основе растительных метаболитов

Морозова Е.А., Толстикова Т.Г., Шульц Э.Э.

Новосибирский институт органической химии им.Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

По данным ВОЗ, на сегодняшний день во всем мире растет количество людей с психоневрологическими расстройствами. Особое место занимают депрессивные состояния и состояния, сопровождающиеся повышенной судорожной активностью. При этом известно, что многие существующие на сегодняшний день психотропные препараты обладают, во-первых, достаточно высокой токсичностью, во-вторых, нежелательными побочными эффектами. Еще одним недостатком использования различных психотропных препаратов является достаточно узкий спектр их действия. Поэтому актуальной является разработка не просто малотоксичных высокоактивных средств, а полифункциональных агентов, которые помимо основного действия обладают дополнительными положительными эффектами. Одним из подходов решения данной проблемы являются химические трансформации биологически активных соединений природного происхождения.

Одним из таких примеров целенаправленных модификаций природных молекул являются производные ламбертиановой кислоты, содержание которой в хвое сибирского кедра в виде свободной кислоты и ее метилового эфира достигает 10%. В НИОХ СО РАН были синтезированы производные ламбертиановой кислоты различных структурных типов, проведен фармакологический скрининг и выявлена связь «структура-активность» в ряду этих соединений. В частности, было показано, что производные ламбертиановой кислоты обладают психотропным действием, проявляющимся в усилении седативной или стимулирующей компоненты антидепрессивного эффекта, в зависимости от введенного в состав молекулы заместителя.

Здесь необходимо обратить внимание на синтез комбинированных соединений, молекулы которых состоят из структурных элементов фармаконов с известной активностью и природных биорегуляторов, как перспективный подход к поиску нейротропных агентов, оказывающих комплексное действие. В результате такой химической конъюгации ламбертиановой кислоты с гамма-аминомасляной кислотой показано усиление ноотропного эффекта полученного соединения. Кроме того, антиамнестическое действие этого агента реализуется на фоне наблюдаемого понижения тревожности. Таким образом, конечное соединение характеризуется сочетанием ноотропного и анксиолитического свойств, что может быть актуально при лечении часто встречающихся нарушений интеллекта и памяти при расстройствах ЦНС.

Изучение структурно-функциональных свойств ортопоксвирусных белков, связывающих фактор некроза опухолей

Непомнящих Т.С., Антоненц Д.В., Гилева И.П., Трегубчак Т.В., Щелкунов С.Н.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
Новосибирск

Белок СгмВ ортопоксвирусов обладает TNF-связывающей активностью (N-концевой домен) и хемокин-связывающей активностью (C-концевой домен SECRET). Показано, что, несмотря на высокую гомологию, белки СгмВ вируса натуральной оспы (VARV) и оспы коров (CPXV), отличаются по своим свойствам. Нами построены модели пространственной структуры комплексов VARV-СгмВ и CPXV-СгмВ с мышинным и человеческим TNF, а также с мутантной формой TNF человека, в которой остаток R в 31 положении заменен на остаток Q, характерный для мышинового TNF [1]. Эксперименты *in vitro* по сравнительному изучению способности рекомбинантных белков VARV-СгмВ и CPXV-СгмВ ингибировать действие указанных TNF показали, что модели комплексов, построенные с использованием в качестве шаблона структуры белка (PDB ID: 2UWI), наилучшим образом согласуются с экспериментальными данными.

Первичная структура SECRET домена демонстрирует отсутствие гомологии как с известными белками позвоночных животных, так и с описанными вирусными хемокин-связывающими белками. В результате моделирования пространственной структуры этого домена *de novo* мы обнаружили, что, по-видимому, он является структурным гомологом секреторируемого СС-хемокин-связывающего белка vCCI CPXV, несмотря на низкую идентичность их аминокислотных последовательностей.

Показано, что рекомбинантный белок VARV-СгмВ обладает высокой иммуногенностью. Выявленная высокая иммуногенность этого белка скорее всего связана с его мультимеризацией.

Полученные модели будут использоваться для создания мутантных и укороченных вариантов белка VARV-СгмВ, которые, возможно, утратят способность к олигомеризации и поэтому будут менее иммуногенными, но сохраняют активность в отношении связывания TNF и/или хемокинов. Такие белки могут быть использованы для разработки новых лекарственных препаратов для анти-TNF терапии.

1. Сандахчиев Л.С. и др. (1998). Бюллетень эксперимент. биологии и медицины. 125, 89–92.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 09-04-00055а).

**(4S,5R,6R)-пара-Мента-1,8-диен-5,6-диол – перспективный агент для разработки
противопаркинсонических средств**

Толстикова Т.Г., Павлова А.В., Волчо К.П., Ильина И.В., Ардашов О.В.

Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

Болезнь Паркинсона — одно из наиболее распространенных неврологических заболеваний с преимущественно двигательными нарушениями, основу лечения составляет заместительная терапия, влекущая за собой серьезные побочные эффекты. Разработка новых безопасных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний, к которым относится болезнь Паркинсона, остается одной из актуальных и важнейших задач современной фармакологии. Синтезированный в лаборатории лесохимии и химии природных биологически активных соединений Новосибирского института органической химии СО РАН (4S,5R,6R)-пара-мента-1,8-диен-5,6-диол, обладающий выраженной противосудорожной активностью, также оказывает потенцирующее действие на предшественника дофамина L-ДОФА, проявляя стимулирующее действие на дофаминергическую систему. Основываясь на этих свойствах, было исследовано влияние данного агента на паркинсонический синдром, вызванный нейротоксином 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином у самцов мышей линии C57Bl/6. Обнаружили, что уже однократное применение агента в дозе 20 мг/кг достоверно снижает выраженность олигокинезии, тремора, ригидности и вегетативных проявлений, таких как саливация и пилоэрекция, на модели экспериментально вызванного паркинсонического синдрома. В длительном эксперименте исследуемый агент значительно снижал летальность животных, вызванную системным введением нейротоксина. Сам агент не оказывает достоверного влияния на поведенческие реакции мышей.

Важным плюсом данного соединения является низкая токсичность (LD_{50} более 4000 мг/кг при пероральном введении, т.е. не менее чем в 7 и 8 раз ниже, чем среднесмертельная доза известных антиконвульсантов сибазона и карбамазепина, соответственно, при аналогичном способе введения).

Таким образом, обнаруженная высокая противопаркинсоническая активность (4S,5R,6R)-пара-мента-1,8-диен-5,6-диола в сочетании с его низкой токсичностью и отсутствие существенного его влияния на психо-локомоторную активность делают данный агент перспективным для разработки нового лекарственного препарата для лечения болезни Паркинсона.

Глицидипин – перспективное гипотензивное и антиаритмическое лекарственное средство

Хвостов М.В., Толстикова Т.Г., Брызгалов А.О.

Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

По данным ВОЗ, сердечно-сосудистые болезни являются основной причиной инвалидности и преждевременной смертности во всем мире. Известно, что большинство используемых лекарственных средств для терапии этих заболеваний обладают рядом нежелательных побочных действий. В связи с этим разработка малотоксичных и высокоэффективных сердечно-сосудистых препаратов является актуальной для современной медицины и фармакологии.

Одним из перспективных подходов в разработке препаратов такого типа является связывание известного лекарственного средства в молекулярный комплекс с глицирризиновой кислотой. Такое комплексообразование обеспечивает защиту фармакона от быстрого метаболизма в организме, улучшает его транспорт через биологические мембраны и позволяет пролонгировать эффект действующего вещества за счет повышения аффинности к органу-мишени.

Механохимическим способом получен комплекс нифедипина с глицирризиновой кислотой в молекулярном соотношении 1:4, который был назван глицидипин.

В результате проведенных исследований было установлено, что глицидипин обладает высокой гипотензивной активностью при внутривенном, внутрибрюшинном и внутрижелудочном способах введения крысам линии Вистар и крысам с наследственной артериальной гипертензией НИСАГ. Действующая доза нифедипина в глицидипине в 10 раз меньше дозы нифедипина, требуемой для проявления аналогичного эффекта. У глицидипина обнаружена антиаритмическая активность, проявляемая в дозе в 29 раз меньшей по сравнению с дозой, в которой он проявляет гипотензивное действие, в то время как для нифедипина антиаритмическое действие принято считать незначимым. Показано, что глицидипин постепенно блокирует Ca^{2+} каналы изолированных нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis*, а его максимальный блокирующий эффект развивается на 25 минут позже нифедипина. На фоне инфаркта миокарда для глицидипина было показано наличие кардиопротективного и антиоксидантного действия. При длительном введении глицидипина в течение 14 дней крысам линии Вистар и 45 дней крысам линии НИСАГ не обнаружено токсического воздействия на жизненно важные органы и системы.

Все изложенное позволяет рекомендовать глицидипин для дальнейшего углубленного доклинического исследования в качестве перспективного гипотензивного и антиаритмического лекарственного средства.

Иммуно- и гемопозактивные свойства индацетамина — иммуномодулятора нового класса

Мирскова А.Н.¹, Колесникова О.П.², Кудяева О.Т.², Левковская Г.Г.¹, Адамович С.Н.¹

¹ Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

Трис-(2-гидроксиэтил)аммониевые соли (индол-3-ил)сульфанилалканкарбоновых кислот, как и их ближайшие аналоги — арилгетероалканкарбоновые кислоты и их алканоламмониевые производные — перспективны как лекарственные средства с иммуно- и эритропоземодулирующей активностью, антиоксидантными, противовоспалительными, адаптогенными, противоопухолевыми свойствами. Нами разработаны новые методы синтеза ряда индол-3-илсульфанил-алканкарбоновых кислот без использования свободных индолов с высокими выходами и высокой степени чистоты, что сделало их доступными для синтеза разнообразных производных и широкого изучения их биологических свойств.

Настоящая работа посвящена результатам исследований нового биологически активного вещества — трис-(2-гидроксиэтил)аммониевой соли (индол-3-ил)сульфанилуксусной кислоты (индацетамина), отобранного в результате скрининга. Установлено, что у интактных животных *in vivo* индацетамин стимулирует гуморальный иммунный ответ, *in vitro* усиливает продукцию IgG, подавляет стимулированную продукцию провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО α), оказывает выраженный эффект на функциональные свойства стволовых кроветворных клеток, стимулирует рост гранулоидных и тормозит рост эритроидных клеток. В экспериментальной модели аутоиммунного заболевания (иммунокомплексный гломерулонефрит) индацетамин проявляет выраженный клинический эффект (повышает массу тела животных, снижает СОЭ, стойко снижает протеинурию, устраняет анемию), что обусловлено подавлением продукции провоспалительных цитокинов, подавлением гиперплазии эритропоэза с ранних стадий дифференцировки эритрона у больных мышей. По данным морфологического изучения, препарат тормозит развитие мезангиального пролиферативного гломерулонефрита. В экспериментальной модели эффект индацетамина сравним с иммунодепрессантом циклоспорином А, но, в отличие от него не обладает нефро- и гепатотоксическим действием.

Влияние пробиотика «Экофлор» на микробиоценоз толстой кишки у больных лимфомами

Солдатов Г.С.^{1,4}, Поспелова Т.И.^{2,4}, Кускова Н.В.⁴, Шихалева Н.Ф.³, Виноградов С.П.⁵

*¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, ² НГМУ,
³ ЦКБ СО РАН, ⁴ НГУ, ⁵ Институт вычислительной математики
и математической геофизики СО РАН, Новосибирск*

В жизнедеятельности организма человека важную роль играет нормальный микробиоценоз, в частности, микрофлора кишечника. Нарушение качественного и количественного соотношения микроорганизмов в кишечнике, транслокация их в тонкую кишку определяется как дисбактериоз. Причины дисбактериоза разнообразны, и важное место в этом имеет цитостатическая терапия.

Цель: изучить клиническую и микробиологическую эффективность пробиотика «Экофлор» в реабилитационной программе больных лимфомами после цитостатической терапии.

Материал и методы: обследовано 89 больных лимфомами в период стойкой клинико-гематологической ремиссии. 49 пациентов получали пробиотик «Экофлор» в течение 21 дня. «Экофлор» состоит из углеродминерального сорбента СУМС-1 и консорциума иммобилизованных на нем бифидо- и лактобактерий. Группу сравнения составили 40 больных лимфомами, сопоставимых по возрасту, получавших обезжиренное молоко. Исследование микробиоценоза кишечника проводили по стандартным методикам. Качество жизни оценивалось по анкете EORTC QLQ CORE 30.

Результаты: у всех пациентов регистрировался дисбиоз II-III степени. Клинические симптомы поражения кишечника отмечены в 86% случаев в основной группе больных и в 80% — в группе сравнения. На фоне приема «Экофлора» количество бифидобактерий увеличилось с $0,6 \pm 0,3$ млрд/г до $0,7 \pm 0,3$ млрд/г ($p < 0,05$), лактобактерий с $4,4 \pm 0,6$ млн/г до $6,3 \pm 0,5$ млн/г ($p < 0,05$), кишечной палочки с $137,5 \pm 21,5$ млн/г до $223,7 \pm 34,4$ млн/г ($p < 0,05$). Произошло уменьшение количества кишечной палочки со сниженными ферментативными свойствами, потенциально-патогенной микрофлоры, энтерококков. Достоверно снизилась активность воспалительного процесса в слизистой кишечника. Улучшились показатели качества жизни. Применение обезжиренного молока, напротив, привело к значительному росту количества энтерококков и не улучшило клинические симптомы поражения кишечника.

Выводы: использование пробиотика «Экофлор» в программе реабилитации больных лимфомами после цитостатической терапии способствует улучшению общего самочувствия, показателей микробиоценоза, снижению активности воспаления в слизистой кишечника, повышению качества жизни пациентов.

Координационные соединения лантанидов как парамагнитные наноразмерные ЯМР-термосенсоры для медицинской магниторезонансной томографической диагностики заболеваний

Бабайлов С.П., Мордвинцева А.В.

Институт неорганической химии им. А.В. Николаева, СО РАН, Новосибирск

Информация о молекулярном строении и парамагнитных свойствах координационных соединений лантанидов (Ln) в растворах лежит в основе существующих технологий получения препаратов для фотодинамической терапии, контрастных реагентов для магниторезонансной томографии и сенсоров для биологии и медицины [1]. Нами экспериментально исследовано методами ЯМР и потенциометрии молекулярное строение, внутримолекулярная динамика и кинетика комплексообразования ряда модельных парамагнитных соединений Ln с краун-эфирами, порфиринами и полиаминополикарбокисильными лигандами в растворах. Установлено, что парамагнитные комплексы Ln благодаря существенной температурной зависимости лантанид-индуцированных сдвигов (ЛИС) в спектрах ЯМР на ядрах лигандов могут выступать в качестве *in vitro* ЯМР-спектроскопических термосенсоров для определения температуры жидких сред. В связи с этим одним из практических применений комплексов Ln, отличных от Gd {комплексы которого уже ранее нашли применение в медицинской магниторезонансной томографии (ММРТ)}, может быть определение локальной температуры тела. Малые пространственные размеры и высокая устойчивость некоторых комплексов Ln в водных средах создают предпосылки их применения в качестве наноразмерных термосенсоров для *in vivo* ММРТ картографирования температуры тела и диагностики заболеваний. В дальнейшем *in vivo* исследования соединений лантанидов планируется продолжить совместно с сотрудниками ИХБФМ и МТЦ СО РАН.

1. Babailov S.P. // Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 2008. 52. 1. P.1–21.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Президиума СО РАН (грант № 67).

Микродуговые кальцийфосфатные биопокрывтия на титане и цирконий-ниобиевом сплаве и их физико-химические и биологические свойства

Шаркеев Ю.П.¹, Легостаева Е.В.¹, Терлеева О.П.², Романенко Е.П.²,
Уваркин П.В.¹, Куляшова К.С.¹, Хлусова М.Ю.³

¹ Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск

² Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, Новосибирск

³ Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Предложен новый подход к формированию кальцийфосфатных покрытий на поверхности титана и цирконий-ниобиевого сплава микродуговым методом в истинных растворах, содержащие комплексные соединения кальция и полифосфаты щелочных металлов. Исследованы физико-химические (фазовый состав, соотношение Са/Р, шероховатость, адгезионная прочность) и биологические свойства кальцийфосфатных покрытий. Показано, что использование для нанесения покрытий электролита, содержащего кальций и фосфор в растворенной форме, обеспечивает синтез бета-трикальцийфосфата и позволяет наносить биопокрывтия с высоким соотношением Са/Р = 1,5–1,6, близким к соотношению в костной ткани. Выявлено, что адгезионная прочность (10–35 МПа) покрытий зависит от материала подложки, толщины покрытий (10–100 мкм) и шероховатостей подложки и покрытия (Ra=1,5–8,5 мкм).

Моделирование процессов остеогенеза *in vitro* на клеточной культуре позволило выявить оптимальный диапазон шероховатости покрытий (Ra=2,5–6,5 мкм), способствующий дифференцировке стромальных стволовых клеток в клетки костной ткани. Биологические испытания *in vivo* показали, что кальцийфосфатное покрытие с шероховатостью в оптимальном диапазоне с вероятностью до 75% способствует формированию костной ткани в тесте эктопического костеобразования. Полученные покрытия представляют интерес для использования в медицинской практике в качестве биопокрывтий на подложки из титана и цирконий-ниобиевого сплава, которые используются для изготовления различных имплантатов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», проект № 21.5, проектов РФФИ, гранты № 08-03-00960а и 09-04-00287а и государственного контракта ФЦП № 02.512.11.2285.

Моделирование физико-химических процессов при нанесении покрытий на имплантаты микродуговым методом и их взаимодействия с биологической жидкостью

Назаренко Н. Н., Князева А. Г.

Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск

Моделирование физико-химических процессов, имеющих отношение к разработке имплантатов, включает задачи разных типов: моделирование процессов нанесения покрытий, растворение покрытий в биологических жидкостях и исследование механического поведения имплантатов с покрытиями. В настоящей работе особое внимание уделено задачам первых двух типов.

Сформулирована модель формирования кальций-фосфатного покрытия на имплантате на основе титана микродуговым методом. Процесс микродугового оксидирования осуществляется в электролитической ванне, залитой раствором электролита, куда помещается оксидируемая деталь, выполненная из титанового сплава. Основные диффузионные и химические процессы протекают в электролите представляющем собой водный раствор трикальций-фосфата и фосфорной кислоты со взвешенными частицами гидроксилapatита. Частицы гидроксилapatита под действием напряжения диссоциируют на ионы, которые вследствие межфазного массообмена пополняют жидкую фазу. Математическая модель включает все названные процессы, а также диффузию.

При численном исследовании задачи показано, что неоднородность в распределении концентраций в растворе уменьшается при увеличении коэффициента межфазного массообмена, при уменьшении коэффициента чувствительности скорости реакции разложения природного фосфата к действию электрического поля, при увеличении коэффициента диффузии в жидкой фазе.

Сформулирована двумерная модель растворения тонкой прямоугольной пластины, выполненной из природного кальций-фосфата, в физиологическом растворе.

На основе данной модели предложен способ оценки коэффициента диффузии и определен коэффициент диффузии кальция в физиологическом растворе.

Для приближенного учета структуры покрытия принято, что оно состоит из упакованных в ряды сферолитов одинакового размера. Сформулирована задача диффузии для отдельного сферолита в квазистационарном приближении. Далее было найдено распределение напряжений по заданному распределению концентраций, используемое для определения времени разрушения сферолитов. Время разрушения сферолита оценивали по двум критериям.

При численном исследовании показано, что время разрушения сферолитов уменьшается с увеличением их размеров, коэффициента диффузии и коэффициента концентрационного расширения.

Программа РАН
«Фундаментальные науки – медицине»
Клеточные технологии для медицины

Особенности функции катехоламиновой нейромедиаторной системы мозга у гипертензивных крыс линии НИСАГ

Маркель А.Л., Рязанова М.А., Федосеева Л.А., Редина О.Е., Смоленская С.Э.,
Пыльник Т.О., Алехина Т.А., Иванова Л.Н.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

У крыс линии НИСАГ с наследственно обусловленной стресс-чувствительной артериальной гипертонией исследованы распределение катехоламинов (норадреналин, адреналин, дофамин) в отделах мозга, экспрессия генов, кодирующих адренорецепторы ($\alpha 1A$) и ферменты биосинтеза (ТН), а также осуществлен поиск генетических локусов, ассоциированных с особенностями функционирования катехоламиновой системы мозга.

Было показано, что в различных отделах мозга гипертензивных крыс НИСАГ имеются существенные изменения концентрации биогенных аминов – норадреналина и дофамина. Эти изменения касаются как онтогенетической динамики, так и дефинитивных значений, полученных при анализе мозга взрослых особей. Причем отмечено, что в разных возрастных периодах изменения могут иметь разнонаправленный характер, однако в участках мозга, играющих наиболее существенную роль в регуляции артериального давления (ядра заднего гипоталамуса и «голубое пятно») зарегистрировано увеличение уровней норадреналина. В этих же областях отмечено повышение экспрессии гена тирозингидроксилазы, ключевого фермента биосинтеза катехоламинов. Уровень экспрессии гена, кодирующего адренорецепторы $\alpha 1A$, повышен у крыс линии НИСАГ в области фронтальной коры, а также в ткани миокарда.

Микросателлитный анализ гибридных популяций позволил идентифицировать 7 генетических локусов, принимающих участие в контроле уровня норадреналина в гипоталамусе (хромосомы 4, 14, 18 и X) и продолговатом мозге (хромосомы 1 и 3). Один локус на 8-й хромосоме оказывает высокодостоверное влияние на концентрацию дофамина в продолговатом мозге. Маркированные участки хромосом включают гены, которые можно рассматривать в качестве генов-кандидатов, принимающих участие в патогенезе стресс-чувствительной артериальной гипертонии у крыс НИСАГ. Не вызывает сомнения существенная роль в этом процессе катехоламиновой нейромедиаторной системы мозга.

Эффект трансплантации ядер клеток неонатальной печени на модели острого токсического гепатита

Боровский Г.Б.¹, Пивоваров Ю.И.², Курильская Т.Е.², Бадуев Б.К.^{1,2}, Голубев С.С.³,
Бабушкина И.В.², Богородская С.Л.², Войников В.К.¹

¹ *Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск*

² *Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН, Иркутск*

³ *Иркутский областной диагностический центр, Иркутск*

Ранее на моделях адреналинового миокардита и токсического гепатита нами было показано, что трансплантация ксеногенных неонатальных клеток сердца ведет к уменьшению повреждения, что сопровождалось ускоренным ростом содержания стрессовых белков в сердечной мышце. В исследованиях очередного периода было установлено, что трансплантация ядер неонатальных клеток печени приводит к большей сохранности ферментативных систем, обеспечивающих процессы трансаминирования и гликолиза, чем при трансплантации неонатальных клеток печени. При динамическом наблюдении за течением токсического гепатита было установлено, что у крыс с трансплантацией ядер отмечалось более существенное нарастание индукторов пролиферации (PCNA) на фоне падения белков — репрессоров пролиферативного процесса (Ki67). Это наглядно свидетельствует о более ранних и выраженных процессах репарации в поврежденной печени у животных с трансплантацией ядер. Выявлен важный факт большего нарастания уровня стресс-белков, как общей (Hsp70), так и индуцибельных форм (Hsp72, Hsp60), особенно к третьим суткам эксперимента у животных с трансплантацией ядер, что подчеркивает более значительную индукцию внутриклеточных защитных механизмов от повреждения.

Таким образом, в условиях развития экспериментального токсического гепатита трансплантация ядер неонатальных клеток печени приводила к большей сохранности ферментативных систем, обеспечивающих процессы трансаминирования и гликолиза, чем при трансплантации неонатальных клеток печени. При этом отмечались меньший уровень пероксидации и поражения гепатоцитов дистрофическим процессом.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

Экспрессия и сигнальные свойства FCRL6, рецептора цитотоксических лимфоцитов человека

Кулемзин С.В.¹, Замошникова А.Е.², Юрченко М.Ю.², Мечетина Л.В.¹, Наякшин А.М.¹,
Сидоренко С.П.², Таранин А.В.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАНУ, Киев, Украина

Цитотоксические Т лимфоциты (ЦТЛ) являются основными эффекторами клеточного иммунитета. При недостаточной активности вирус-специфических ЦТЛ могут развиваться хронические вирусные заболевания, а при активации аутоспецифичных ЦТЛ – аутоиммунные заболевания. В настоящее время нет полного понимания всех процессов, контролирующих активность ЦТЛ, однако очевидно, что регуляция осуществляется за счет сигналов поверхностных рецепторов ЦТЛ, которые связываются с растворимыми молекулами или белками клеток-мишеней. Ранее нами был описан новый рецептор ЦТЛ FCRL6. Он является членом семейства FcR-подобных белков и имеет уникальный профиль экспрессии: в ЦТЛ, активированных *in vitro* митогенами, его экспрессия резко падает, а в лейкоцитах больных СПИДом III-IV стадии возрастает. Кроме того, экспрессия FCRL6 снижается в ЦТЛ больных некоторыми аутоиммунными заболеваниями. Таким образом, можно заключить, что его экспрессия находится в обратной зависимости от функциональной активности ЦТЛ. Для поиска функций FCRL6 необходимо детальное изучение его внутриклеточной части, несущей два тирозин-содержащих сигнальных мотива, предположительно относящихся к ингибирующим мотивам (ITIM). Для определения роли этих мотивов в инициации сигнальных каскадов нами было изучено связывание адаптерных белков, фосфатаз и киназ с мутантами (без тирозинов Y356 и Y371, входящих в состав ITIM-мотивов) и немутантными ITIM-подобными мотивами FCRL6. Было показано, что эти остатки при фосфорилировании способны связывать внутриклеточные тирозин-фосфатазы. Для связывания SHP-1 и SHP-2 фосфатаз необходим тирозин второго ITIM мотива (Y371), однако присутствие тирозина первого мотива (Y356) повышает эффективность связывания. Y356 необходим для связывания SHIP-1 и только при наличии обоих тирозинов FCRL6 связывается с SHIP-2. Тирозин киназы Syk, Zap-70 и серин/треонин киназа PKD2 не взаимодействуют с FCRL6. Обнаружено взаимодействие FCRL6 с адаптерным белком Grb2, что позволяет предположить участие FCRL6 в запуске MAPK каскада. Таким образом, FCRL6 действительно обладает свойствами ингибирующего рецептора.

Визуализация стволовых клеток костного мозга крысы зеленым флуоресцентным белком

Артемьева Л.В., Матвеев А.Л., Майбородин И.В., Юн Т.Э., Савельева Т.Е., Матвеева В.А.

Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН Новосибирск

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга крысы трансфецировали плазмидной ДНК, несущей ген зеленого флуоресцентного белка. Трансфекция МСК плазмидной ДНК $peGFP-N_1$ (Clontech, USA) подтверждена методом флуоресцентной микроскопии. Трансфецированные клетки поддерживались в культуре, сохраняя морфологические и пролиферативные свойства МСК. После введения трансфецированных МСК крысам этой же линии было обнаружено, что клетки, синтезирующие зеленый флуоресцентный белок, формировали эндотелий и наружную оболочку функциональных кровеносных сосудов и, возможно, капилляры. Таким образом, показано, что трансфецированные МСК могут быть использованы как инструмент визуализации при изучении свойств стволовых клеток.

Работа поддержана грантами РАН «Фундаментальные науки — медицине» 2009 г.

Протеолитическая активность антител молока человека

Одинцова Е.С., Бунева В.Н., Невинский Г.А.

*Институт химической и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

Во время беременности и особенно после начала лактации организм женщины временно характеризуется иммунным статусом, сходным с таковым для больных аутоиммунными заболеваниями. Ранее в молоке здоровых по медицинским показаниям рожениц были обнаружены антитела (АТ) с ДНКазной, РНКазной, АТРазной, липид- и протеинкиназными активностями. В данной работе было установлено, что sIgA молока обладают казеин-гидролизующей активностью. В соответствии с рядом жестких критериев показано, что протеазная активность является собственным свойством АТ, а не совыделяющихся ферментов. Установлено, что АТ гидролизуют только в-казеины молока человека и коровьего молока, являются в основном сериновыми протеазами, и в пуле sIgA присутствует небольшая фракция абзимов со свойствами металлопротеаз. Относительные количества эндогенных металлов, связанных с sIgA молока, уменьшаются в ряду: $Ca > Mg \geq Al > Fe \approx Zn \geq Ni \geq Cu \geq Mn$, после их удаления общая активность абзимов значительно снижается. Из пула АТ молока была выделена фракция sIgA-металлопротеаз. Относительная активность АТ-металлопротеаз, содержащих эндогенные металлы, возрастала в 1.2–1.9 раз при добавлении в реакцию смесь экзогенных металлов ($Mg^{2+} > Fe^{2+} > Cu^{2+} \geq Ca^{2+} \geq Mn^{2+}$). Удаление эндогенных металлов из фракции sIgA-металлопротеаз приводило к снижению активности на ~80%. sIgA-металлопротеазы, очищенные от эндогенных металлов, проявляли высокую казеин-гидролизующую активность в присутствии индивидуальных металлов ($Fe^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} \geq Ni^{2+}$), а также при использовании смеси нескольких ионов металлов: $Fe^{2+} + Ca^{2+} > Fe^{2+} + Co^{2+} > Fe^{2+} + Zn^{2+} > Ca^{2+} + Zn^{2+} > Mg^{2+} + Ca^{2+} > Co^{2+} + Ca^{2+}$. Добавление в реакцию смесь различных ионов металлов приводило к накоплению разных продуктов гидролиза 22-членного олигопептида, соответствующего одному из сайтов расщепления в-казеина молока человека.

Работа была поддержана грантами Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» № 21.16, РФФИ № 07-04-00387, Аналитической ведомственной целевой программой «Развитие научного потенциала высшей школы» № 2.1.1/5580, Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 98 и проектом СО РАН со сторонними организациями (ТИБОХ ДВО РАН) № 111.

Постерная сессия I

Эффективный метод синтеза несимметричных тетраметилиндо(ди)карбоцианиновых красителей для генодиагностики и секвенирования

Абрамова Т.В., Сильников В.Н.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Олигонуклеотиды, содержащие флюоресцентные красители, к настоящему времени нашли широкое применение в молекулярной биологии и медицине. Особенно широко они используются в генодиагностике и секвенировании ДНК [1]. Флюоресцентные красители, предлагаемые на рынке продуктов для молекулярно-биологических исследований, покрывают широкий диапазон видимого спектра поглощения и излучения; среди них значительный интерес представляют 3,3,3',3'-тетраметил-2,2'-индо(ди)карбоцианины. Коммерчески доступные соединения являются, как правило, готовыми олигонуклеотидными или трифосфатными конструкциями, включающими в себя цианины Cy3TM и Cy5TM, однако достаточно часто возникает необходимость в получении нестандартных несимметричных цианиновых красителей, например, для поиска соединений с новыми спектральными свойствами или для селективного мечения предварительно синтезированных блоков молекулярного ансамбля по выбору исследователя.

Нами осуществлен эффективный синтез несимметричных 3,3,3',3'-тетраметил 2,2'-индо(ди)карбоцианинов — аналогов Quasar 570[®] (Cy3TM) и Quasar 670[®] (Cy5TM), — содержащих активную функциональную группу. В случае тетраметилиндодикарбоцианинового красителя синтез несимметричного соединения проводили путем последовательного взаимодействия линкера с соответствующими гетероциклическими соединениями аналогично [2], при этом их различная реакционная способность обеспечивала высокую селективность реакции. В случае тетраметилиндодикарбоцианинового красителя эффективность синтеза несимметричного соединения, содержащего только одну активную функциональную группу, достигалась тщательным подбором соотношения реагентов в зависимости от реакционной способности.

С использованием активированных эфиров синтезированных цианиновых красителей с высоким выходом получены флюоресцентные γ -амиды трифосфатов нуклеозидов аналогично [3].

1. Klostermeier D., Millar D. P. Biopolymers. 2002. V. 61. P. 159–179.
2. Квач М. В., Гонтарев С. В., Прохоренко И. А., Степанова И. А., Шманай В. В., Коршун В. А. Изв. Ак. наук. Сер. хим. 2006. № 1. С. 154–158.
3. Abramova T. V., Vasileva S. V., Koroleva L. S., Kasatkina N. S., Silnikov V. N. Bioorg. Med. Chem. 2008. V. 16. P. 9127–9132.

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00990а и 08-04-90038-Бел_а.

Получение одноцепочечных антител против вируса клещевого энцефалита

Байков И.К., Леванов Л.Н., Матвеев Л.Э., Тикунова Н.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Одноцепочечные антитела являются аналогами иммуноглобулинов и представляют собой рекомбинантные белки, в которых вариабельные домены легкой и тяжелой цепей природного антитела объединены гибким олигопептидом. Сохраняя специфичность исходного антитела, они обладают меньшими размерами, благодаря чему легче проникают в ткани и клетки. Эти свойства, а также возможность получения одноцепочечных антител в бактериях определили перспективность применения таких молекул в различных сферах науки и медицины.

Цель данной работы – получение одноцепочечных антител против поверхностного гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита. На основе генетического материала клеток, продуцирующих вируснейтрализующие моноклональные антитела против этого белка [1], были получены фрагменты ДНК, которые кодируют вариабельные домены легкой и тяжелой цепей исходных антител. Эти фрагменты были встроены в плазмиду, которую затем использовали для получения одноцепочечных антител в клетках *E. coli*. Иммуноферментным анализом подтверждено сохранение специфичности полученных антител к рекомбинантному белку Е – аналогу гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита [2]. Кроме того, этим же методом были определены равновесные константы диссоциации комплексов антиген • антитело.

Определение нуклеотидных последовательностей ДНК, кодирующих вариабельные домены антител, и последующий анализ выявили высокую степень сходства между исходными антителами, а также показали существенные отличия по сравнению с известными последовательностями антител против вируса клещевого энцефалита и родственных вирусов.

Таким образом, в результате этого исследования были получены два одноцепочечных антитела против поверхностного гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита, а также исследованы некоторые свойства этих антител.

1. Tsekhanovskaya N.A., Matveev L.E., Rubin S.G., Karavanov A.S. and Pressman E.K. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype). // *Virus Res.* - 1993. V. 30 P.1–16.
2. Белавин П., Нетесова Н., Решетников С. Экспрессия фрагментов гена Е вируса японского энцефалита в клетках *Escherichia coli* // *Биотехнология.* 1997. № 3. С. 3–9.

Структура и свойства внеклеточных РНК плазмы крови человека

Барякин Д.Н., Семенов Д.В., Кулигина Е.В., Камынина Т.П., Коваль О.А., Рихтер В.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Известно, что рибонуклеиновые кислоты, являясь одним из наиболее многофункциональных биополимеров, функционируют не только в цитоплазме или ядре клетки, но также во внеклеточных жидкостях млекопитающих, например, в плазме крови человека. Однако структура и функции внеклеточных РНК человека в настоящее время исследованы лишь частично.

Целью данной работы является определение первичной структуры РНК, циркулирующих в плазме крови человека, и анализ влияния таких РНК на жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

Определение последовательностей РНК плазмы крови проводили по следующей схеме: РНК подвергали обратной транскрипции, кДНК лигировали с олигонуклеотидным адаптером и амплифицировали. Полученные ДНК-копии внеклеточных РНК были клонированы в клетках *E. coli*. Было показано, что в плазме крови человека циркулируют фрагменты интронов пре-мРНК, L1- и Alu-содержащие транскрипты и короткие олигонуклеотиды, которые могут быть отнесены к малым интерферирующим РНК [1]. Методом RT-PCR подтверждено, что в плазме крови человека наряду с фрагментами рРНК и мРНК присутствуют Alu- и L1-содержащие РНК. Установлено, что диапазон изменения концентраций РНК, содержащих «левые» Alu-мономеры, существенно шире, чем диапазон изменения концентраций фрагментов рРНК, мРНК GAPDH, а также РНК-форм, содержащих Alu-димеры.

С помощью транскрипции *in vitro* РНК полимеразой фага T7 были получены синтетические аналоги РНК плазмы крови человека и проведен анализ влияния аналогов на жизнеспособность клеток рака молочной железы человека MCF-7. Было установлено, что большинство полученных аналогов внеклеточных РНК не оказывает существенного влияния на жизнеспособность раковых эпителиоцитов. В то же время инкубация MCF-7 с Alu-транскриптами приводит к существенному снижению жизнеспособности клеток. Полученные нами результаты, а также анализ литературных данных, позволяют заключить, что Alu-содержащие РНК являются эффективными межклеточными регуляторами трансляции.

1. Dmitry V. Semenov, Dmitry N. Baryakin, Tatyana P. Kamynina, Elena V. Kuligina, and Vladimir A. Richter, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1137: 130–134 (2008).

Получение одноцепочечных антител человека против фактора некроза опухолей и изучение их свойств

Вихрова М.А.^{1, 2}, Тикунова Н.В.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Новосибирск*

Фактор некроза опухолей (ФНО-б) является одним из важнейших иммунорегуляторных белков, участвующих в развитии, функционировании и поддержании иммунной системы и организма в целом. Исследования показали критическую роль ФНО-б как для развития иммунного ответа и структурной организации лимфоидных органов, так и негативную роль ФНО-б как индуктора и медиатора развития многих аутоиммунных заболеваний и воспалительных патологий, в том числе рассеянного склероза. К факторам, способным блокировать действие ФНО-б, относятся растворимые рецепторы ФНО-б, ингибиторы синтеза и высвобождения ФНО-б, а также специфические антитела.

Одним из подходов к созданию терапевтических антител является получение моноклональных антител с помощью гибридных технологий. Однако получение человеческих гибридом сопряжено с рядом трудностей, поэтому целью данной работы являлся отбор одноцепочечных антител человека, специфически связывающих ФНО-б, из комбинаторных библиотек с помощью метода фагового дисплея для последующего конструирования на их основе полноразмерных моноклональных антител человека против ФНО-б.

Для отбора специфических антител были использованы 2 комбинаторные библиотеки: аутоиммунная комбинаторная библиотека, сконструированная на основе мРНК периферических лимфоцитов, выделенных от больных рассеянным склерозом, и неиммунная комбинаторная библиотека, сконструированная на основе мРНК периферических лимфоцитов, выделенных от здоровых доноров. Были исследованы иммунохимические свойства полученных одноцепочечных антител против ФНО-б. Определены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих эти антитела, проанализированы соответствующие им аминокислотные последовательности.

Работа поддержана междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 76.

**Молекулярный анализ генов, кодирующих белки VP4, VP6, VP7 ротавирусов,
выявленных при асимптоматической форме ротавирусной инфекции у детей**

Жираковская Е.В.^{1,2}, Тикунов А.Ю.^{1,2}, Тикунова Н.В.^{1,2}

*¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
Новосибирск*

Ротавирусы группы А являются наиболее распространенной причиной тяжелого гастроэнтерита у детей раннего возраста и пожилых людей. У детей до 3 месяцев жизни ротавирусная инфекция может протекать в асимптоматической форме. Природа этого явления до сих пор не ясна. Большую роль могут играть специфические антитела, присутствующие в грудном молоке, в то же время возможно существование генетических отличий ротавирусов, выявленных при разных формах инфекции.

В ходе проведения пятилетнего исследования молекулярно-генетического разнообразия ротавирусов, циркулирующих у детей в Новосибирске, было выявлено 6 случаев асимптоматической формы ротавирусной инфекции. Анализировались гены, кодирующие структурные белки VP4 (P-генотип), VP6 и VP7 (G-генотип), которые участвуют в процессе проникновения вируса в клетку, и содержат антигенные детерминанты, определяющие генетическое разнообразие ротавирусов.

В 4 случаях были определены ротавирусы генотипа P[8]G1 или P[8]G3 и микст-инфекция P[8]G1+G3. Вирусы данных генотипов с большой частотой встречались и в пробах от детей с диареей. При этом нуклеотидные последовательности генов, кодирующих анализируемые белки ротавирусов, выявленных при разных формах инфекции, имели высокую степень гомологии в рамках соответствующих генотипов. В то же время в двух пробах от детей неонатального возраста были выявлены ротавирусы редкого генотипа P[9]G3, который до этого времени не встречался в пробах от больных гастроэнтеритом. Вирус генотипа P[9]G3 был выявлен в единичной пробе от ребенка с диареей через полтора года. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих белки VP4, VP6 и VP7 ротавирусов генотипа P[9]G3, показал, что они формируют на филограммах соответствующих генов отдельные кластеры. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей данных белков вирусов генотипа P[9]G3, выявленных при асимптоматической и симптоматической формах инфекции, показал наличие нескольких замен в поверхностных белках VP7 и VP4 (в области гемагглютинации), которые могут изменять третичную структуру белков и влиять на вирулентность вируса.

Масс-спектрометрическое определение варфарина и его метаболитов в плазме крови

Кузнецова А.А.^{1,2}, Ткачева Н.А.¹, Лифшиц Г.И.², Новикова Я.В.²,
Тихонов А. Я.³, Федорова О.С.^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

³ Новосибирской институт органической химии им. Н.Н. Воронцова СО РАН, Новосибирск

Производное кумарина – варфарин, относится к непрямые антикоагулянтам (НАК) и применяется для профилактики и лечения артериальных и венозных тромбозов, а также с целью уменьшения вероятности развития тромбоэмболии. Данное соединение является конкурентным антагонистом витамина К и, таким образом, снижает эффекты витамин К-зависимых факторов свертывания крови.

Варфарин представляет собой рацемическую смесь (S)- и (R)-энантиомеров. Фармакологически (S)-варфарин в 3-5 раз более активен, чем (R)-варфарин. Исследования последних лет показали, что существуют генетические факторы, влияющие на чувствительность больных к варфарину. Режим дозирования варфарина устанавливают индивидуально, в зависимости от определения протромбинового времени или международного нормализованного соотношения. Выбор неправильных доз может привести к избыточной или недостаточной антикоагуляции.

Целью настоящей работы явилась разработка методики определения варфарина и его метаболитов в плазме крови методом масс-спектрометрии. Для этого в качестве стандартных образцов были синтезированы варфарин и ряд его метаболитов: 7-гидроксиварфарин, 6-гидроксиварфарин, 4'-гидроксиварфарин и варфариновый спирт (продукт восстановления кето-группы боковой цепи).

Для определения концентрации варфарина и его метаболитов в плазме крови проводили их экстракцию смесью $\text{CHCl}_3:\text{Et}_2\text{O}$ (20:80 v/v). После экстракции органическую фазу упаривали и сухой остаток растворяли в смеси $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (30:70 v/v). Затем полученную смесь варфарина и его метаболитов разделяли с помощью обращенно-фазовой хроматографии (Nucleosil C18) в линейном градиенте ацетонитрила (20→50%). Колонка была соединена с масс-спектрометром Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies). Концентрацию определяли по калибровочной кривой, полученной с помощью стандартных растворов варфарина и его метаболитов. Полученные результаты показывают, что данная методика позволяет эффективно определить концентрацию варфарина и его метаболитов в плазме крови.

Работа поддержана Интеграционным грантом СО РАН № 90.

Антитела против основного белка миелина имеют гомологию с антителами против вируса Эпштейна-Барра и антителами против цитомегаловируса

Матвеев А.Л.¹, Морозова В.В.², Тикунова Н.В.²

¹ *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

² *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

Рассеянный склероз (РС) – аутоиммунное заболевание, при котором иммунная система атакует центральную нервную систему, что приводит к разрушению оболочки нервных волокон – миелина, и в крови больного появляются антитела против основного белка миелина (МВР). К настоящему времени полагают, что причины возникновения аутоиммунного заболевания многофакторны. Генетическая предрасположенность, нарушения работы иммунной системы и гормональной регуляции и факторы внешней среды играют большую роль в развитии патогенеза аутоиммунного заболевания. Из всех этих факторов важную роль играют инфекции. Показано, что развитие ряда аутоиммунных заболеваний связано с наличием в организме вируса Эпштейна-Барр (EBV) и цитомегаловируса (CMV).

Из аутоиммунной комбинаторной библиотеки одноцепочечных человеческих антител, сконструированной на основе мРНК периферических лимфоцитов пациентов с РС, было отобрано 5 антител против МВР. На основании нуклеотидных последовательностей Vh- и Vh-генов были идентифицированы 4 уникальных антитела. После сравнительного анализа аминокислотных последовательностей Vh- и Vh-доменов этих антител, проведенного при помощи баз данных BLAST, была показана гомология 3 антител с антителами против LMV 1 (latent membrane protein) EBV; одно из этих антител гомологично антителу против гликопротеина В CMV. Гомология составляла от 88 % (anti-CMV) до 92 % (anti-EBV).

Поиск гиперпредставленных участков хромосом в составе внеклеточных ДНК для рационального дизайна диагностических ПЦР-систем

Морозкин Е.С.¹, Лосева Е.М.¹, Задесенец К.С.², Бондарь А.А.¹, Брызгунова О.Е.¹,
Пермякова В.И.³, Рубцов Н.Б.², Власов В.В.¹, Лактионов П.П.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

³ *Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск*

Поиск функционально значимых участков генома в составе внеклеточной ДНК, изменения в которых могут служить маркерами онкопатологии, является актуальной задачей современной диагностической медицины. Поскольку многие опухоль-специфические маркеры тканей не выявляются в составе циркулирующих ДНК, для решения поставленной задачи необходимы знания о ДНК районах, гиперпредставленных в циркулирующих ДНК. Онкомаркеры, локализованные в таких районах, могут быть использованы для разработки неинвазивной или малоинвазивной ранней диагностики и мониторинга эффективности терапии рака, основанной на анализе циркулирующих ДНК крови.

Для выявления гиперпредставленных районов хромосом мы провели сравнительный анализ внеклеточной ДНК первичных и длительно культивируемых клеток с геномной ДНК родительских клеток методом двухцветной флуоресцентной гибридизации *in situ*. Было показано, что в составе внДНК, связанной с поверхностью первичных эндотелиоцитов и фибробластов, а также клеток HeLa, наиболее представлена ДНК прицентромерного района хромосомы 9. Свободная внДНК первичных эндотелиоцитов и клеток HeLa не отличается по составу от апоптической ДНК в то время как в составе свободной внеклеточной ДНК первичных фибробластов наиболее представлена ДНК прицентромерного района хромосомы 9 и последовательностей ДНК дистальных плечей акроцентрических хромосом 13, 14, 15, 21, 22.

На следующем этапе нами был выполнен анализ удельного содержания рибосомного повтора (GenBank U13369.1), который по литературным данным локализован в обнаруженных областях, и LINE1 элементов в плазме здоровых доноров и больных раком молочной железы при помощи метода количественного ПЦР. В результате анализа было показано, что удельное содержание рибосомного повтора в составе циркулирующей ДНК в среднем в 8 раз превышает содержание последовательности LINE1 элемента в крови здоровых и больных доноров. Таким образом, полученные данные могут быть использованы для поиска онкомаркеров, локализованных в выявленных районах хромосом и разработке на их основе диагностических тестов.

Детекция полиморфизма С677Т в гене МНТФР с использованием тандемных биспиренильных зондов на основе олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов)

Новопашина Д.С., Холодарь С.А., Воронина Е.Н., Филипенко М.Л.,
Ломзов А.А., Венямина А.Г.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Разработка методов диагностики генетических нарушений является одной из актуальных проблем химической биологии и фундаментальной медицины. Вариабельность генома на 90% определяется точечными мутациями. Точечные мутации могут быть причиной ряда тяжелых наследственных заболеваний, а однобуквенные замены в вирусных и бактериальных генах зачастую являются причиной устойчивости патогенов к лекарственным препаратам. Наиболее изученной мутацией гена метилентетрагидрофолатредуктазы (МНТФР), играющей ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты, является полиморфизм С→Т в положении 677. Этот полиморфизм связан по крайней мере с четырьмя группами многофакторных заболеваний: сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями, врожденными дефектами развития нервной системы, а также дефектами развития плода.

Задачей данной работы было создание новых флуоресцентных зондов, представляющих собой тандемы 5'- и 3'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов), и изучение их потенциала как новых зондов для молекулярно-биологических исследований и генетической диагностики.

Проведено исследование возможности детекции полиморфизма С677Т в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (МНТФР) с использованием предложенных зондов. Предварительно продемонстрирована их стабильность в условиях ПЦР, а также устойчивость к действию нуклеаз сыворотки. Исследована термическая стабильность дуплексов с участием созданных тандемных зондов, а также их флуоресцентные свойства. Выявлено влияние структуры линкеров между пиренильным остатком и олигонуклеотидом, количества пиренильных остатков на стыке тандема, наличия 3'-«инвертированного» тимидина и положения мисматча на изменение спектров флуоресценции дуплексов зондов с ДНК мишенями.

Разработанные зонды были использованы для детекции полиморфизма С677Т непосредственно в амплификационной смеси.

Работа поддержана программами РАН «Фундаментальные науки — медицине» и «Молекулярная и клеточная биология», грантом РФФИ (№ 08-04-01634-а) и ГК ФАНИ № 02.522.12.2005.

Уровни 8-оксогуанина и 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (OGG1) в нервных клетках крыс OXYS и Wistar

Саттарова Е.А.^{1,2}, Синицина О.И.², Жарков Д.О.¹, Невинский Г.А.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

Образование 8-оксогуанина, одного из самых распространенных окислительных повреждений ДНК кислородными радикалами, может приводить к появлению мутаций, провоцировать гибель клетки или ее злокачественное перерождение. Нарушение механизмов репарации ДНК приводит к различным патологическим процессам, в число которых входят канцерогенез, дефекты развития и старение.

Методом иммунофлуоресцентной микроскопии оценено содержание 8-оксогуанина и 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы в нервных клетках гиппокампа и фронтальной коры 1- и 3-месячных крыс OXYS, характеризующихся гиперпродукцией активных форм кислорода, и контрольной линии крыс Wistar. Показано увеличение уровня 8-оксогуанина в немаркированных нервных клетках с возрастом для крыс обеих линий, при этом уровень 8-оксогуанина у крыс линии OXYS был статистически достоверно выше по сравнению с крысами линии Wistar всех исследованных возрастов. В возрасте 3 месяцев в нестин- и GFAP-содержащих нервных клетках уровень 8-оксогуанина был выше по сравнению с немаркированными клетками для крыс обеих линий. Уровень OGG1 в нестин- и GFAP-содержащих нервных клетках был также выше по сравнению с немаркированными клетками, как в возрасте 1 месяца, так и в возрасте 3 месяцев. В немаркированных клетках статистически достоверных внутри- и межлинейных различий в уровне OGG1 не выявлены.

Оценено влияние витамина Е и 4-(3-додецилтиопропил)-2,6-диметилфенола (соединение Ф-3) на уровень 8-оксогуанина и OGG1 в нервных клетках крыс. Показано, что витамин Е незначительно снижает содержание 8-оксогуанина в клетках мозга, а соединение Ф-3 существенно понижает уровень 8-оксогуанина по сравнению с витамином Е. Поскольку соединение Ф-3 не влияет на уровень OGG1, удаляющей 8-оксогуанин из ДНК, следует полагать, что соединение Ф-3 эффективно снижает действие активных форм кислорода на ДНК за счет своих антиокислительных свойств.

Работа поддержана грантами Программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» № 21.16 и «Молекулярная и клеточная биология» № 22.14, а также РФФИ №№ 07-04-00395, 08-04-00596, Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 98.

Изменения белкового спектра плазмы крови больных психическими расстройствами

Смирнова Л.П.¹, Шишигина Н.С.³, Герасимова Ю.В.², Фёдорова О.С.², Иванова С.А.¹

¹ *НИИ психического здоровья СО РАМН, Томск*

² *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

³ *Сибирский государственный медицинский университет, Томск*

Протеомика открывает новые возможности для изучения изменений происходящих на уровне белков при многих болезнях. Появление баз данных всех белков человека позволяет идентифицировать белки по молекулярной массе с помощью протеомного анализа. Шизофрения — заболевание неустановленной этиологии и патогенеза, приводящее к стойким нарушениям социальной адаптации и трудоспособности. До сих пор не удалось обнаружить наличия биохимического дефекта, строго специфичного для этой болезни.

Проанализирован белковый спектр плазмы крови 36 человек. Из них 15 человек находились на лечении в отделении эндогенных расстройств НИИ психического здоровья СО РАМН с диагнозом шизофрения; 8 человек на лечении в отделении пограничных состояний того же института и имели диагноз невротическое, связанное со стрессом, расстройство. Группу контроля составили 13 психически и соматически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту. Исследуемые образцы подвергались аффинной хроматографии с целью удаления 6 мажорных белков. Фракции белков, не связавшиеся с аффинной сорбентом, после предварительного концентрирования анализировали с помощью гель-электрофореза в полиакриламидом геле.

В результате исследования выявлено, что все изученные больные и шизофренией и истерией имели достоверные отличия с контрольной группой в белковом спектре в следующих областях молекулярных масс: 165–195 кДа, 70–110 кДа, 40–45 кДа и менее 25 кДа. У всех пациентов с невротическими расстройствами для белков в области молекулярных масс 40–45 кДа на электрофореграмме наблюдались 2 узких полосы. У больных разными формами шизофрении картина в данной области была неоднозначна: для половины пациентов наблюдалась 1 широкая полоса, у другой половины — 2 узких. В остальных обозначенных областях белкового спектра различий между больными шизофренией и неврозами не получено. Изменений в белковом спектре в зависимости от пола, возраста и длительности заболевания у обследованных лиц не выявлено. Исследованные образцы будут в дальнейшем подвергнуты масс-спектрометрическому анализу для конкретизации выявленных изменений в белковом спектре.

Работа выполнена частично при финансовой поддержке Интеграционного гранта СО РАН № 90.

Аптамеры как потенциальные средства диагностики и лечения рассеянного склероза

Фокина А.А., Тиванова А.С., Безуглова А.М., Невинский Г.А., Веньямина А.Г.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Применение аптамеров для разработки подходов к лечению и диагностике различных заболеваний является одним из актуальных и приоритетных направлений химической биологии и фундаментальной медицины.

Рассеянный склероз (РС) – тяжелое хроническое прогрессирующее аутоиммунное заболевание центральной нервной системы. Одним из маркеров РС является появление в организме большого аутоантител, разрушающих миелиновую оболочку нервных волокон.

В данной работе предложен новый подход к ингибированию патологических процессов, протекающих при рассеянном склерозе. Он основан на использовании устойчивых в биологических средах 2'-Ф-пиримидинсодержащих РНК-аптамеров для связывания с аутоантигенами, которые продуцируются организмом при РС.

Разработана процедура SELEX для отбора таких РНК-аптамеров. В качестве мишени использован пул поликлональных аутоантител, выделенных из 10 образцов сыворотки крови пациентов с рассеянным склерозом. В процессе SELEX проводилось связывание 2'-Ф-пиримидинсодержащей РНК-библиотеки в условиях, близких к физиологическим, с пулом поликлональных аутоантител, иммобилизованных на стенках ПЦР-пробирки. С использованием новой разработанной процедуры SELEX проведено 10 раундов отбора РНК-аптамеров.

Было исследовано влияние 2'-Ф-пиримидинсодержащей РНК-библиотеки после 10-го раунда SELEX на реакцию гидролиза основного белка миелина аутоантигенами. На основании полученных данных можно сделать предварительный вывод, что 2'-Ф-пиримидинсодержащая РНК-библиотека ингибирует протеазную активность патогенных аутоантител.

Для выделения РНК-аптамеров, наиболее эффективно связывающих патогенные антигена, 2'-Ф-пиримидинсодержащую РНК-библиотеку после 10-го раунда SELEX разделяли по сродству к аутоантигенам на колонке с иммобилизованным пулом поликлональных аутоантител.

Выделение конкретных последовательностей РНК-аптамеров и изучение их способности связываться с аутоантигенами, а также подавлять их демиелинизирующую активность даст возможность использовать данные РНК-аптамеры в качестве основы при создании потенциальных терапевтических препаратов для лечения и диагностики рассеянного склероза.

Работа поддержана Грантом мэрии г. Новосибирска (№ 29-08, 2008-2009 гг.).

Астровирусная инфекция среди взрослых больных острыми кишечными инфекциями в г. Новосибирске

Тикунов А.Ю.^{1,2}, Жираковская Е.В.^{1,3}, Нетесов С.В.^{2,3} Демина А.В.⁴ Тикунова Н.В.^{1,3}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

³ *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Новосибирск*

⁴ *МУЗ Городская клиническая инфекционная больница №1, Новосибирск*

Астровирусы – небольшие по размеру вириона и генома РНК-содержащие вирусы, вызывающие у людей острый гастроэнтерит. По зарубежным данным, астровирусный гастроэнтерит преимущественно встречается у детей младшего возраста, хотя, по данным ряда исследователей, взрослые также могут им болеть. До сих пор нет данных о роли астровирусов в инфекционной патологии ЖКТ у взрослых в азиатской части России, поэтому и было предпринято настоящее исследование.

В работе исследовали встречаемость астровирусной инфекции среди взрослых больных, госпитализированных в городскую инфекционную клиническую больницу № 1 г. Новосибирска с диагнозом «острая кишечная инфекция» (ОКИ). В период с марта по июль 2009 года было протестировано более 100 образцов фекалий от больных с ОКИ из этой больницы, из которых около 4,5% оказались положительными на наличие астровирусов. Таким образом, в Новосибирске астровирусные гастроэнтериты у взрослых пациентов, госпитализированных с ОКИ, встречаются приблизительно в 2 раза реже, чем у детей младшего возраста. У всех выявленных астровирусов была определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена, кодирующего белок капсида. По полученным последовательностям было построено филогенетическое древо и по нему определена их генотипическая принадлежность. Большинство выявленных у взрослых астровирусов относилось к 1-му генотипу, лишь в одной пробе был обнаружен астровирус 6-го генотипа. Поскольку в GenBank отсутствует полногеномная последовательность астровируса 6-го генотипа и он является редко встречающимся, было проведено определение нуклеотидной последовательности генома астровируса 6-го генотипа.

Вируснейтрализующие антитела — биомаркеры ортопоксвирусных инфекций

Хлусевич Я.А.^{1, 2}, Дубровская В.В.², Бормотов Н.И.², Беланов Е.Ф.², Тикунова Н.В.^{1, 2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Новосибирск*

Известно, что при ортопоксвирусной инфекции в организме животных и человека образуются антитела против широкого спектра вирусных белков. Эти антитела присутствуют в сыворотке на протяжении многих лет. Спектры антител, продуцируемых в организме животных и человека, несколько различаются. Так, сыворотки иммунизированных мышей выявляли белки с молекулярными массами 62, 59, 39, 36, 32, 27, 25, 21, 14 и 11 кДа.

При исследовании методом Вестерн-блот анализа сывороток добровольцев, вакцинированных вирусом осповакцины, нами были выявлены антитела против ряда вирусных белков, причем наиболее интенсивно окрашивались белки с молекулярными массами 62, 35 и 14 кДа. На основе мРНК лимфоцитов, выделенных из этих сывороток, была сконструирована иммунная комбинаторная фаговая библиотека одноцепочечных антител человека. Из этой библиотеки были отобраны одноцепочечные антитела против вируса оспы коров (ВОК). Большая часть из них специфически связывала белок р35 в Вестерн-блот анализе и была способна нейтрализовать инфекционность ВОК. Было доказано, что выявляемый этими антителами белок кодируется ОРТ Н3L. Была исследована способность одноцепочечных антител человека, нейтрализующих инфекционность ВОК, ингибировать инфекционность вируса осповакцины (ВОВ) и вируса оспы обезьян (ВОО). Было показано, что 6 из 7 протестированных антител обладали вируснейтрализующей активностью и в отношении ВОВ. Для 3 фаговых антител показана вируснейтрализующая активность в отношении ВОО. Фаговое антитело, подавляющее бляшкообразование ВОК на 45–55%, не ингибировало инфекционность ВОО и ВОВ. Титры фаговых антител, при которых наблюдалась нейтрализация бляшкообразования ортопоксвирусов, т.е. уменьшение количества бляшек не менее чем на 50%, составили менее 10¹³ БОЕ/мл.

Влияние боковых заместителей на фото-химические свойства фталоцианинов

Черноносков А.А.^{1,2}, Beate Röder³, Федорова О.С.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Институт экологии человека, Кемерово, Россия*

³ *Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Physik, Newtonstraße 15, 12489, Berlin, Germany*

В настоящее время применение фотосенсибилизаторов на основе фталоцианинов Zn(II) и Al(III) в фотодинамической терапии злокачественных образований осложнено их низкой растворимостью в воде. Решением данной проблемы может являться использование фталоцианинов, несущих заряженные боковые радикалы, что значительно повышает растворимость данных реагентов.

В качестве боковых заместителей могут быть использованы различные функциональные группы. Кроме увеличения растворимости в воде они могут менять и другие свойства фотосенсибилизаторов. Особенный интерес представляет изучить влияние таких заместителей на фотохимические и фототоксические свойства фталоцианинов.

В настоящей работе были исследованы водорастворимые фталоцианины, содержащие либо по одному периферийному заместителю в виде длинной цепи: олигодезоксирибонуклеотид d(C)₂₀ или ДНК-связывающий лиганд, либо восемь коротких разветвленных заместителей, несущих заряд.

Был определен квантовый выход генерации синглетного кислорода как исходных фталоцианинов, так и их производных, растворенных в D₂O, в DMF и в 0,7%-ном растворе DMF в D₂O.

Для всех исследуемых соединений были зарегистрированы спектры поглощения и флуоресценции, определены времена жизни флуоресценции и синглетного кислорода.

Полученные данные представляют собой теоретическую основу для дальнейшей разработки высокоэффективных реагентов на основе конъюгатов олигонуклеотидов с фталоцианинами.

Работа поддержана грантом РФФИ (08-04-00334), госконтрактом № 02.740.11.0079.

**Видоспецифичная идентификация ортопоксвирусов, патогенных для человека,
на основе метода мультиплексной ПЦР в реальном времени**

Щербаков Д.Н., Гаврилова Е.В., Максютлов Р.А., Щелкунов С.Н.

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Новосибирск*

В 1980 ВОЗ официально декларировала о ликвидации натуральной оспы во всем мире и рекомендовала прекращение оспопрививания, что было продиктовано в частности осложнениями, сопровождающими течение вакцинального процесса. Однако прекращение вакцинации привело к формированию прослойки людей лишенных специфического иммунитета против вируса натуральной оспы (VARV), и с каждым годом эта прослойка увеличивается. Отсутствие оспопрививания лишило человека защиты и от других патогенных для человека ортопоксвирусов (OPV).

Все это говорит, с одной стороны, о потребности разработки вакцин нового поколения и новых антивирусных препаратов, с другой стороны, о необходимости создания быстрых и точных методов диагностики ортопоксвирусных инфекций. Цель нашей работы – создание простого и надежного способа типирования патогенных для человека OPV (VARV, вирус оспы обезьян (MPXV), вирус оспы коров (CPXV), вирус осповакцины (VACV)).

Нуклеотидные последовательности 85 штаммов 6 видов OPV были выровнены с помощью программы BioEdit v.7.0, muscle v.3.6. для нахождения потенциальных видоспецифичных районов. Для VARV это район OPT_A38R, для MPXV – OPT_B7R, CPXV – OPT_D11L, для VACV – OPT_B10R. Для каждого района были найдены пара родоспецифичных праймеров и видоспецифичный гибридационный зонд.

Определение специфичности отобранных зондов проводили на панели полноразмерной ДНК 17 штаммов 4 видов OPV. ПЦР анализ с выщеплением 5' концевой метки (TaqMan система) проводили на приборе Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, США). Различные штаммы VARV, MPXV, CPXV и VACV были успешно идентифицированы. Аналитическая специфичность найденных нами олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов в наших экспериментах составила 100%. Для определения чувствительности использовали рекомбинантные плазмиды содержащие фрагменты последовательностей ДНК OPV патогенных для человека. Метод позволяет выявлять 6 копий в реакции для праймеров и зонда специфичных CPXV, 15 копий для VARV, 18 копий для MPXV, 60 копий для VACV. Таким образом, нами разработан метод на основе ПЦР в реальном времени позволяющий обнаруживать и однозначно типировать патогенные для человека OPV в мультиплексном формате с высокой чувствительностью и 100%-ной специфичностью.

Трифосфаты, содержащих новую линкерную алкинаминогруппу для функционализации нуклеиновых кислот

Васильева С.В., Коневец Д.А., Будилкин Б.И., Сильников В.Н.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Функционально модифицированные нуклеиновые кислоты – перспективные инструменты молекулярной биологии и используются в различных фундаментальных и прикладных исследованиях. Если химический синтез модифицированных олигонуклеотидов является сейчас почти рутинной процедурой, в ферментативном методе такого прогресса нет. В настоящее время большое количество исследований посвящены синтезу и изучению субстратных свойств C-5-amino-модифицированных трифосфатных производных, подходящих для введения различных функциональных групп в ДНК ферментативным методом. Распространенным является введение защищенного аллиламинолинкера в C5 положение уридина или цитидина с использованием палладий-катализируемой реакции присоединения с соответствующими галогенпроизводными. Однако последующее удаление защитной группы приводит к формированию бициклического цитозинового аналога [1], а в случае уридинового производного этот продукт может стать основным [2]. Аллиламинолинкер может быть заменен на пропаргиламино- [3]. Такие трифосфаты, как было показано [1], являются субстратами для многих полимераз, но могут возникать пространственные ограничения при функционализации группой большого размера.

В данной работе предлагаются трифосфатные производные с новой линкерной пропинилоксипропиламино группой, которая может быть введена в C5 положение дезокси- и дидезоксиуридина или цитидина одинаково успешно с использованием реакции присоединения по тройной связи к соответствующим йодопроизводными. Трифосфаты полученных нуклеозидов были синтезированы различными методами с выходами 54–86%. На основе трифосфатного производного дезоксицитидина с новым алкинаминолинкером был получен аналог дезоксицитидина, несущий биотиновую метку. Биотин может быть присоединен непосредственно по аминолинкеру, а также через удлиняющую конструкцию с аминокaproновой кислотой. Этот аналог дезоксицитидинтрифосфата был использован в реакции полимеризации и показал хорошие субстратные свойства.

1. Bioorgan. Medicin. Chem. Lett. 2000. V. 10. P. 1299–1302.
2. J. Chem. Commun. 2006. V. 33, P. 3516–3518.
3. J. Org. Chem. 1989. V. 54. P. 3420–3422.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ(№ 07-04-00990-а, 08-04-90038 Бел_а).

Генетические и белковые онкомаркеры в диагностике рака желудка

Елистратова Е.В.¹, Шелестюк П.И.², Тузиков С.А.³,
Власов В.В.¹, Лактионов П.П.¹, Рыкова Е.Ю.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Областной онкологический диспансер, Новосибирск*

³ *НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, Томск*

Современные методы диагностики, как инструментальные, так и биохимические, не позволяют выявлять рак желудка на ранних стадиях, что приводит к высокой смертности от этого заболевания. Обнаружение генетических и эпигенетических изменений во внеклеточных ДНК (внДНК) плазмы/сыворотки крови открывает большие возможности для разработки чувствительных методов ранней диагностики рака желудка.

В работе определена частота встречаемости метилированной формы генов опухолевой супрессии p15, hMLH1 и MGMT в суммарных внДНК крови на разных стадиях заболевания раком желудка и проведен анализ ассоциации эпигенетических изменений с повышенным уровнем белковых онкомаркеров РЭА, СА 72.4, СА 19.9.

Обнаружено, что метилированная форма хотя бы одного из трех исследованных генов (p15, hMLH1, MGMT) с высокой частотой выявляется в суммарных внДНК на разных стадиях заболевания при раке желудка (T_2 — 71%, T_3 — 80%, T_4 — 100%). Частота детекции изменения статуса метилирования хотя бы одного из трех генов в группе больных, не имеющих метастазы в регионарные лимфатические узлы, статистически достоверно не отличается от таковой в группе больных, у которых были диагностированы регионарные метастазы (67% и 89% соответственно). Эти данные свидетельствуют о перспективности использования анализа метилирования генов опухолевой супрессии в суммарных внДНК для ранней диагностики рака желудка. Чувствительность метода, основанного на выявлении метилированных форм генов p15 и hMLH1 в суммарных внДНК при раке желудка оказалась существенно выше по сравнению с иммуноферментным анализом белковых маркеров СА 19.9, СА 72.4 (63% и 30% соответственно). Отсутствие статистически значимой корреляции между эпигенетическими и белковыми онкомаркерами позволяет сделать вывод о том, что данные параметры отражают разные стороны патогенеза рака желудка и могут быть использованы в качестве независимых дополнительных критериев при диагностике рака желудка.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 06-04-49732a и 09-04-01334a, грантов СО РАН № 13 по междисциплинарному проекту и № 12, выполняемого совместно со сторонними научными организациями (2006–2011).

Новый подход к получению «эскорт»-аптамеров методом SELEX

Привалова А.С., Воробьева М.А., Владимирова А.В., Веняминова А.Г.,
Зенкова М.А., Власов В.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Разработка подходов к селективному воздействию на опухолевые клетки является одной из важных проблем современной фундаментальной медицины. Для создания препаратов, способных воздействовать на опухоль, не затрагивая при этом здоровые органы и ткани, необходимо обеспечить как адресную доставку препарата к опухолевым клеткам, так и его эффективное проникновение в клетки. Перспективным подходом к решению этих задач представляется использование РНК-аптамеров, обладающих высоким сродством к определенным белкам на поверхности клеток, так называемых «эскорт»-аптамеров. При получении аптамеров методом SELEX на целые клетки одной из повторяющихся стадий является отделение связавшихся/проникших молекул РНК от общей массы РНК. Классическим способом выделения модифицированного РНК-аптамера из смеси с клеточной РНК является обработка рибонуклеазой А. Нами был предложен и апробирован новый метод отделения модифицированного РНК-аптамера с использованием искусственных РНКаз. Данный способ позволяет избежать случайного загрязнения образцов РНКазой А, а также дает возможность исключить дополнительные стадии, связанные с необходимостью инактивации фермента на каждом раунде селекции. Для отработки нового протокола был использован модельный олигорибонуклеотид, представляющий собой укороченный анти-PSMA аптамер A10 [1], в котором все пиримидиновые звенья были заменены на их 2'-фтор-аналоги. Было проведено сравнительное исследование расщепления суммарной клеточной РНК в смеси с РНК-аптамером с помощью серии искусственных рибонуклеаз на основе диазобициклооктана, содержащего различные заместители (остаток имидазола, дипептиды), а также пептидоподобных соединений [2]. Полученные результаты позволяют рассматривать использование искусственных рибонуклеаз как альтернативу стандартным методам выделения аптамерной последовательности.

1. Lupold S. E., Hicke B. J., Lin Y., Coffey D. S. *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 14. P. 4029–4033.
2. I. L. Kuznetsova and V. N. Sil'nikov. In: *Nucleic Acids and Molecular Biology.* 2004. V. 13. P. 111–128.

Работа поддержана программой РАН «Фундаментальные науки – медицине» и грантом Президента РФ для поддержки молодых российских ученых МК-642.2008.4.

Авторы благодарят зав. ЛОРС Сильникова В.Н. за предоставленные искусственные РНКазы.

Постерная сессия II

Тандемная масс-спектрометрия – ключ к разрешению важнейших аспектов неонатального скрининга

Алексеева И.В., Коваль В.В., Федорова О.С.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Основной целью неонатального скрининга является диагностика новорожденных на наличие у них наследственных заболеваний, связанных с нарушением метаболизма не только аминокислот, но также и карбоновых и жирных кислот. Раннее медицинское вмешательство во многих случаях позволяет избежать не только физической и умственной деградации, но и даже смертельного исхода. Техника анализа метаболитов в крови существует уже более 50 лет и основана на ингибировании бактериального роста в присутствии соответствующего метаболита [1]. В настоящее время ей на смену приходит более эффективный и быстрый метод тандемной масс-спектрометрии (ES-MS/MS). Огромный успех этого подхода обеспечен выгодным сочетанием методов пробоподготовки и детекции [2]. Для анализа используется высушенное на химически инертной бумаге пятно крови, которое элюируют в метанол, содержащий в качестве внутренних стандартов, изотопномеченные аминокислоты. Супернатант декантируют и упаривают, добавляют бутанол в смеси с HCl и нагревают до 60 °С для образования бутиловых эфиров свободных карбоксильных групп аминокислот. В масс-спектрометре в режиме «neutral loss» (NL) детектируются все предшественники, подвергшиеся утрате какого-либо общего фрагмента. В нашем случае это бутил-формиат (102 кДа), который образуется при диссоциации, вызванной соударением анализируемых частиц. Однако утрата бутил-формиата не является общей для всех аминокислот, и, следовательно, не все из них могут быть детектированы данным способом. Поэтому, чтобы обойти это ограничение, нами был использован режим «multiple reaction monitoring» (MRM), при котором для каждого метаболита задается его индивидуальный ион-предшественник и продукт-ион. С помощью данного метода на основании анализа пятна крови диаметром 3 мм можно определить более 50 заболеваний, затрачивая на каждый анализ не более 2 минут. Несмотря на широкий спектр возможностей данной техники, метод все еще нуждается в дальнейшем усовершенствовании для того, чтобы полностью реализовать свой потенциал.

1. Guthrie R., Susi A. Pediatrics 1963, V. 32, P. 338.
2. De Hoffmann E. J. Mass Spectrom. 1996, V. 31, P. 129.

Работа выполнена при поддержке гранта Программы РАН № 21 «Фундаментальные науки – медицине» (№ 22).

Механизмы взаимодействия интегразы ВИЧ-1 с ДНК

Баранова С.В.¹, Тузиков Ф.В.², Захарова О.Д.¹, Невинский Г.А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Институт катализа Сибирского отделения РАН им. Г. К. Борескова, Новосибирск*

Взаимодействие белков с нуклеиновыми кислотами является жизненно важным процессом организма. Интерес к ДНК-зависимым ферментам актуален еще и потому, что они являются мишенями для противовирусных, антибактериальных и антираковых препаратов. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) входит в семейство ретровирусов и является возбудителем одного из самых опасных заболеваний современного общества – СПИД. Одним из направлений химиотерапии ВИЧ-инфекции является использование ингибиторов ключевых ферментов вируса – интегразы (ИН), обратной транскриптазы и протеазы.

Несмотря на то что многие аспекты функционирования интегразы достаточно хорошо изучены, механизмы обеспечения специфичности при узнавании и расщеплении вирусной ДНК остаются невыясненными.

Цель работы заключалась в анализе закономерностей взаимодействия интегразы ВИЧ-1 с ДНК. Методом последовательного усложнения структуры лиганда проведен детальный анализ закономерностей взаимодействия интегразы ВИЧ со специфическими и неспецифическими ДНК. Показано, что ИН ВИЧ-1 взаимодействует с неспецифическими и специфическими ДНК приблизительно с одинаковой эффективностью, увеличение сродства в случае последних составляет примерно порядок. Высокая специфичность действия фермента обеспечивается стадией взаимной конформационной адаптации ИН и ДНК, которая увеличивает скорость реакции в случае специфической ДНК на 7–8 порядков.

Впервые показано, что специфические олигонуклеотиды, соответствующие 3'-концевой последовательности расщепляемой цепи вирусной ДНК, активируют ИН ВИЧ-1. Методом малоуглового рентгеновского рассеяния показано, что под действием олигонуклеотидов образуются каталитически активные димерные и тетрамерные формы ИН. Сделано предположение, что активная форма ИН, катализирующая полную реакцию интеграции и обеспечивающая специфичность действия фермента, является тетрамером, сформированным из двух разных димеров, образующихся под действием специфических и неспецифических ДНК.

Работа была поддержана грантами Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» № 21.16, а также РФФИ № 07-04-00315, Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 98.

A novel role for Na⁺, K⁺-ATPase as a signal transducer

Spicarova Z.¹, Xiao Li Lu¹, Bondar A. A.² and Aperia A.¹

¹ *Department of Woman and Child Health, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*

² *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia*

Recent studies have revealed additional roles for the ubiquitous ion pump, Na,K-ATPase, as a signal transducer. Na,K-ATPase can form a signaling microdomain with the inositol 1,4,5 triphosphate receptor (IP3R). Ouabain, an endogenous ligand of Na,K-ATPase, triggers a direct interaction between the N-terminus tail of the catalytic alpha subunit of Na,K-ATPase and the IP3R, resulting in calcium oscillations with a periodicity of several minutes. The Na,K-ATPase/IP3R interaction can be facilitated by ankyrin, which acts as a scaffolding protein. Despite being a partner in a protein complex, Na,K-ATPase appears to be highly mobile in the plasma membrane, as shown with fluorescent recovery after photo-bleaching (FRAP).

An oscillatory calcium response provides a highly versatile signal, since the cell can decode the frequency of the oscillations. Downstream effects of calcium oscillations triggered by the Na,K-ATPase/IP3R complex include activation of the transcription factor NF-kB, protection from apoptosis and growth promotion. It has been reported that a fragment of agrin, that is cleaved by neurotrypsin, can bind to the catalytic subunit of Na,K-ATPase and inhibit enzyme activity. We have in ongoing studies observed that non-inhibitory concentrations of agrin will also trigger slow calcium oscillations, NF-kB activation, protection from apoptosis and growth stimulation. Taken together these findings indicate that signaling from the ubiquitous Na,K-ATPase/IP3R microdomain are of importance for tissue protection and regeneration.

AQP4 role in renal K⁺ transport

Bondar A.A.¹, Zelenin S.M.², Zelenina M.N.^{2,3}, Li Y.², Kamali-Zare P.³,
Brismar H.^{2,3} and Aperia A.²

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia*

² *Woman & Child Health, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*

³ *Department of Applied Physics, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden*

The collecting duct principle cells (PC) play a major role for concentration of urine and regulation of K⁺ homeostasis. Two water channels, AQP3 and AQP4, are expressed in the PC basolateral membrane (BLM). Here we present evidence that AQP4 participates in regulation of renal K⁺ transport. K⁺ enters the cell via Na⁺,K⁺-ATPase mediated transport in BLM. The presence of K⁺ channels in BLM, which is deeply infolded, thus providing a diffusion limited space, permits K⁺ recirculation, considered important for maintenance of membrane potential. Here we show with co-immunoprecipitation and GST pulldown assays, that in rat renal papilla, AQP4, but not AQP3, assembles with Na⁺,K⁺-ATPase and the K⁺ channel Kir7.1. This led us to hypothesize that AQP4, Na⁺,K⁺-ATPase and Kir7.1 form a K⁺ transporting microdomain, where AQP4 water transport maintains a favorable gradient for K⁺ efflux and stabilizes membrane potential. A mathematical model of K⁺ transport across an epithelial cells with a deeply infolded BLM supported the hypothesis and predicted an even higher impact of AQP water transport on K⁺ transport if AQP water permeability is sensitive to fluctuations in extracellular K⁺ concentration ([K⁺]_o). To test this, AQP3 and AQP4 were expressed in MDCK cells, a cell line with much in common with PC. Water permeability was increased when [K⁺]_o was 12mM in cells expressing AQP4 but not in cells expressing AQP3.

Functional and molecular interactions between aquaporins and Na,K-ATPase

Illarionova N.B.¹, Gunnarson E.¹, Li Y.¹, Brismar H.¹, Bondar A.A.³,
Zelenin S.M.¹ and Aperia A.¹

¹ *Department of Woman and Child Health, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*

² *Department of Applied Physics, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden*

³ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia*

The water channel aquaporin 4 (AQP4) is abundantly expressed in astrocytes and provides a mechanism by which water permeability of the plasma membrane can be regulated. Astrocytes play a key role in the clearance of potassium (K⁺) and glutamate released during neuronal activity. Emerging evidence suggests that water transport via AQP4 facilitates K⁺ clearance by astrocytes and contributes to recovery of neuronal excitability. Here we report that AQP4 can assemble with its regulator metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) and with Na,K-ATPase; the enzyme responsible for active K⁺ transport and for establishing the electrochemical gradient across the cell plasma membrane. We have, by use of GST pull down assays, identified the segment containing the amino acid residues 23-32 in the AQP4 NH₂-terminus as the site for interaction with Na,K-ATPase catalytic subunit and with mGluR5. Mutagenesis studies revealed that the amino acids K27 and W30 are of key importance for interaction with both Na,K-ATPase and mGluR5. To confirm that interaction also occurs in intact cells, we have performed fluorescence resonance energy transfer (FRET) studies in primary astrocytes derived from rat striatum. The results indicate close proximity of wild type AQP4 and Na,K-ATPase in the plasma membrane of astrocytes. FRET efficiencies observed with the mutants AQP4 K27A and W30A were significantly lower, underlining the importance of these residues for the interaction between AQP4 and Na,K-ATPase. We conclude that AQP4/Na,K-ATPase/mGluR5 can form a macromolecule complex/transporting microdomain in astrocytes. This complex may be of functional importance for the regulation of water and K⁺ homeostasis in the brain as well as for neuron-astrocyte metabolic crosstalk.

Регуляция сплайсинга пре-мРНК рибосомного белка S16 человека – потенциального участника канцерогенеза

Иванов А.В., Парахневич Н.М., Малыгин А.А., Карпова Г.Г.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Известно, что рибосомные белки могут принимать участие в регуляции биосинтеза продуктов протоонкогенов и генов-супрессоров опухолей. Кроме того, при развитии раковых заболеваний часто наблюдают изменения уровня экспрессии генов различных рибосомных белков. Учитывая тот факт, что на стадиях транскрипции и трансляции мРНК синтез рибосомных белков регулируется координировано, можно предположить, что эти изменения связаны с нарушением регуляции сплайсинга пре-мРНК рибосомных белков. Недавно получены данные, свидетельствующие о том, что рибосомный белок S16 (rpS16) участвует в регуляции функции опухолевого супрессора – белка p53. В настоящей работе с использованием рекомбинантного rpS16 человека и фрагмента кодирующей его пре-мРНК изучена роль rpS16 в регуляции сплайсинга своей пре-мРНК *in vitro*.

С помощью фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах показано, что rpS16 специфично связывается с фрагментом кодирующей его пре-мРНК, содержащим первый экзон, первый интрон и часть второго экзона. Результаты энзиматического футпринтинга этого фрагмента показали, что rpS16 защищает от гидролиза РНКазами фосфодиэфирные связи, расположенные в районе ветвления, где, как известно, происходит связывание мРНК U2, и в меньшей степени - в области 3'-сайта сплайсинга. Эффективность вырезания интрона из фрагмента пре-мРНК в условиях сплайсинга *in vitro* уменьшалась с увеличением концентрации rpS16 в реакционной смеси. Повышение концентрации rpS16 до 8 мкМ приводило к практически полному подавлению сплайсинга этого фрагмента пре-мРНК. О специфичности ингибирования сплайсинга в присутствии rpS16 свидетельствовал тот факт, что rpS10 и rpS13, взятые в тех же концентрациях, лишь незначительно влияли на вырезание первого интрона.

На основании полученных данных сделан вывод, что rpS16 может регулировать сплайсинг собственной пре-мРНК по принципу «обратной связи», конкурируя с мРНК U2 за связывание с пре-мРНК и тем самым обеспечивая точный контроль экспрессии своего гена. Очевидно, что нарушение контроля биосинтеза rpS16 на стадии сплайсинга его пре-мРНК должно приводить к нарушению функционирования опухолевого супрессора p53.

Работа поддержана грантом (№ 08-04-00593-а) Российского фонда фундаментальных исследований.

Выявление, количественные оценки и типирование *Helicobacter pylori* в биоптатах слизистой оболочки желудка больных гастритом и язвенной болезнью методом ПЦР-РВ

Иванов М.К.^{1,2}, Титов С.Е.¹, Панасюк Г.В.¹

¹ ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

³ НО «Медсанчасть 168», Новосибирск

Инфекция, вызываемая бактерией *Helicobacter pylori*, является одной из наиболее распространенных в мире. Инфицирование *H. pylori*, как правило, происходит в молодом возрасте, однако то или иное заболевание обычно развивается спустя несколько десятков лет. К ассоциированным с *H. pylori* болезням относят хронический гастрит, язвенную болезнь желудка и 12-перстной кишки, МАЛТ-лимфому и аденокарциному желудка.

Риск развития болезни у человека может зависеть от штамма, носителем которого он является. Способность *H. pylori* колонизировать слизистую оболочку желудка (СОЖ) и вызывать ее воспаление определяется генетическими детерминантами, разделяемыми на две основные группы: факторы *вирулентности*, способствующие нарушению физиологических процессов в желудке, и факторы *колонизации*, позволяющие бактерии существовать на СОЖ. Определение характера связи между генотипами микроорганизма и клиническими исходами — одна из наиболее динамично развивающихся областей изучения *H. pylori*. Уровень обсемененности СОЖ *H. pylori* может существенно варьировать, но диагностическая значимость оценки этого показателя нуждается в определении.

Как для количественных оценок обсемененности, так и для генотипирования *H. pylori* перспективным представляется метод ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в реальном времени (ПЦР-РВ), однако он пока не применяется для этих целей в диагностике хеликобактерной инфекции в России. Нами созданы тесты на основе ПЦР-РВ для выявления и количественных оценок обсемененности *H. pylori* в биопробах, а также его типирования по основным факторам вирулентности *saгA* и *VacA s1/s2*. Проведен анализ 164 биоптатов СОЖ больных гастритом и язвой желудка (оценка обсемененности, ассоциации генотипов, корреляции высокой обсемененности, генотипа и патологии, валидация контроля эффективности ПЦР и алгоритма количественной оценки). Показана более высокая чувствительность предложенных методик по сравнению с распространенными подходами (оценка обсемененности с помощью гистологического исследования и генотипирование при помощи ПЦР с электрофоретической детекцией). Показано отсутствие клинической значимости выявления *H. pylori* в слюне.

**Особенности вирусов гриппа, вызвавших сезонный подъем заболеваемости
в Новосибирской области в 2008-2009 г**

Игнашкина М.Б., Курская О.Г., Романовская А.А., Дурыманов А.Г., Кулак М.В.,
Шестопалов А. М., Ильичева Т. Н.

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Новосибирск*

Мониторинг за распространением гриппа необходим для отбора компонентов противогриппозных вакцин и определения инфицирования людей новыми вирусами гриппа, которые могут стать сигналом начала пандемии. Помимо этого, определение мутаций в геноме циркулирующих вариантов вируса гриппа, которые отвечают за устойчивость вирусов к противогриппозным лекарственным препаратам, требуется для проведения эффективной терапии гриппа. Вирусологический и молекулярно-биологический мониторинг может обеспечить базу для получения такой информации.

Как показали исследования, подъем заболеваемости гриппом в Новосибирске и области в сезоне 2008–2009 г. был обусловлен циркуляцией вирусов гриппа А(Н1N1), А(Н3N2) и В. Для 17 (11%) из 153 образцов, поступивших в Центр от людей с клиническими симптомами гриппа, удалось изолировать вирус гриппа. Все штаммы были изолированы на культуре клеток MDCK. В реакции торможения гемагглютинации (РТГА) восемь изолятов (47%) было типировано как Н1N1, пять (29%) – как Н3N2 и четыре (24%) – как В. Результаты РТГА были подтверждены ПЦР-анализом сезонных изолятов. Были получены последовательности нуклеотидов генов гемагглютинина и определена филогенетическая принадлежность вирусов, циркулирующих в регионе. Филогенетический анализ показал, что вирусная популяция штаммов А(Н1N1) гетерогенна по своим свойствам: среди изолятов встречались варианты, подобные эталону А/Washington/01/2009, а также штаммы, близкие по свойствам к эталону А/Brisbane/59/2007. Все вирусы А(Н3N2) были вариантами эталона А/Victoria/502/2009.

Данные таких исследований особенно актуальны в период угрозы пандемии, поскольку полученная информация позволит лучше подготовиться к грядущему эпидемиологическому сезону.

Импульсный двойной электрон-электронный резонанс (PELDOR) — спектроскопия ЭПР как «молекулярная линейка» для структурной протеомики

Кузнецов Н.А.¹, Милов А.Д.³, Коваль В.В.^{1,2}, Самойлова Р.И.³, Гришин Ю.А.³,
Кнорре Д.Г.¹, Цветков Ю.Д.³, Федорова О.С.^{1,2}, Дзюба С.А.^{2,3}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

³ *Институт химической кинетики и горения СО РАН, Новосибирск*

Из структурных данных известно, что ДНК-связывающие ферменты и белки зачастую претерпевают существенные изменения конформаций при взаимодействии с ДНК-субстратами; в свою очередь, нуклеиновые кислоты также достаточно сильно изменяют свою структуру. Результаты наших недавних кинетических исследований ферментативных процессов с участием ферментов репарации ДНК (Fpg-белка, hOgg1 и Ape1), полученные в предстационарных условиях методом остановленной струи с регистрацией флуоресценции остатков Trp фермента или 2-аминопурина в ДНК, свидетельствуют о том, что имеет место многофазное изменение конформаций ферментов и ДНК как в ходе стадий образования фермент-субстратных комплексов, так и в ходе каталитических стадий.

В данной работе мы использовали ЭПР-спектроскопию (с использованием спиновых меток) для изучения изменений в структуре белков и ДНК в процессах репарации ДНК, катализируемых ДНК-гликозилазами.

Используемый метод импульсного двойного электрон-электронного резонанса (PELDOR) позволяет надежно и точно измерять расстояния между спиновыми метками введенными в различные положения надмолекулярных белково-нуклеиновых комплексов. В работе [1] изучены структурные особенности изменения геометрических параметров двуцепочечной ДНК, содержащей ненуклеотидные вставки – модель удаления поврежденного основания с помощью ДНК-гликозилазы.

Метод электронного спинового эха (ЭСЭ) представляется перспективным для изучения молекулярной динамики биологических комплексов в нативных состояниях.

Kuznetsov N. A. et al. Phys. Chem. Chem. Phys. 2009, V. 11, P. 6826.

Работа выполнена при поддержке Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН (48); РФФИ (07-04-00191, 08-04-12211); Программы РАН «Фундаментальные науки – медицине» (№ 22).

Сборка района 40S субчастицы рибосомы человека, содержащего участок связывания IRES-элемента вируса гепатита С

Ильин А.А., Яньшина Д.Д., Малыгин А.А., Карпова Г.Г.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Вирус гепатита С (ВГС) – один из опаснейших патогенов человека. Его геномная РНК, в отличие от клеточных мРНК, не содержит кэпа, однако благодаря наличию особого высокоструктурированного участка на ее 5'-конце она успешно использует клеточный аппарат трансляции для синтеза кодируемых ею белков. Этот участок (IRES) обладает уникальной способностью прочно связываться с 40S субчастицей рибосомы, обеспечивая правильное расположение стартового AUG-кодона без участия факторов инициации трансляции. Известно, что в узнавании IRES ВГС 40S субчастицей принимают участие рибосомные белки S3а, S5, S16/S18 и р40, формирующие часть ее «головы». Поэтому представляет интерес осуществить сборку рибонуклеопротеида, соответствующего району 40S субчастицы, содержащему эти белки, с последующим использованием его для детального моделирования процесса узнавания IRES ВГС субчастицей. Для этой цели мы применяли подход, основанный на использовании рекомбинантных рибосомных белков и РНК-транскриптов, содержащих их участки связывания.

Рибосомные белки S5, S16 и S18 – гомологи белков S7, S9 и S13 соответственно, участки связывания которых на 16S рРНК известны из данных рентгеноструктурного анализа рибосом бактерий. Поэтому на первом этапе для сборки части «головы» 40S субчастицы мы использовали белки S5, S16 и S18 и фрагмент 1203-1271/1510-1698 18SpРНК, соответствующий району 16S рРНК, содержащему участки связывания их бактериальных гомологов. Показано, что хотя каждый из используемых белков способен самостоятельно связываться с фрагментом 3Dс, при их совместном связывании наблюдали заметный синергетический эффект, что свидетельствует о кооперативном характере связывания. С помощью химического и ферментативного футпринтинга установлены нуклеотиды, меняющие свою доступность действию молекулярных зондов в присутствии рибосомных белков. Показано, что большая часть этих нуклеотидов расположена в тех районах фрагмента 3Dс, которые соответствуют участкам связывания гомологичных рибосомных белков в 16S рРНК. Вместе с тем обнаружены участки, которые не соответствуют участкам связывания их бактериальных гомологов в 16S рРНК, где, по-видимому, связываются эукариот-специфичные фрагменты рибосомных белков.

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 08-04-00593-а)

Эукариотические продуценты рекомбинантного лактаптина - проапоптотического пептида человеческого молока

Коваль О.А.^{1,2}, Фомин А.С.¹, Семенов Д.В.,
Кулигина Е.В.¹, Матвеева В.А.¹, Рихтер В.А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск*

Природные пептиды, обладающие способностью индуцировать апоптоз, рассматриваются как потенциальные противораковые препараты. Ранее в нашей лаборатории было показано, что фрагмент 66-123 к-казеина молока человека способен индуцировать апоптоз клеток аденокарциномы молочной железы в культуре. Разработка генно-инженерных конструкций, кодирующих рекомбинантные аналоги лактаптина, была направлена на усиление проапоптотической активности пептида и продукцию таких аналогов в эукариотических системах. Клетки китайского хомячка CHO DG₄₄dhfr⁻ были трансфицированы рекомбинантными конструкциями, и, в результате селекции, были отобраны клоны, экспрессирующие аналоги лактаптина.

Показано, что ростовая среда, кондиционированная клетками-продуцентами рекомбинантного лактаптина, содержит лактаптин и индуцирует апоптоз раковых клеток человека в культуре — аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, карциномы легкого A549 и карциномы гортани HEP-2, но не оказывает влияния на пролиферацию и рост немалигнизированных клеток — мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека. Разработанные клетки-продуценты представляют перспективную основу для полупрепаративного получения аналогов лактаптина.

Работа поддержана Государственным контрактом № 02.512.11.2257 и Интеграционным проектом СО РАН № 18 (2009–2011).

Связывание белков SBP2 и р40 с рибосомами человека и роль р40 в формировании участка связывания IRES HCV

Косинова О.А.^{1,2}, Малыгин А.А.¹, Кроль А.², Карпова Г.Г.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Институт клеточной и молекулярной биологии ИЦНИ, Страсбург, Франция*

Во всех живых организмах синтез белка осуществляется рибосомами. В этот процесс, кроме мРНК, несущих генетическую информацию, и молекул аминоксил-тРНК, вовлечено множество белковых факторов, обеспечивающих высокую точность и скорость трансляции. Среди них можно выделить белок SBP2, ответственный за включение остатков селеноцистеина в полипептидную цепь белков, участвующих в ключевых процессах жизнедеятельности клетки. Нарушение функций этих белков приводит к тяжелым патологиям (мышечная дистрофия, мужское бесплодие и др.). Кроме того, представляет интерес рибосомный белок р40, который, по-видимому, обладает регуляторной функцией, поскольку содержание его в рибосомах зависит от их трансляционной активности. Этот белок является также предшественником ламинисвязывающего белка, который отвечает за рост и формирование тканей и органов, его повышенная экспрессия является контролирующим фактором метастазирования некоторых видов раковых опухолей. Более того, некоторые вирусы (например, клещевого энцефалита) используют этот белок в качестве рецептора для проникновения в клетки.

В настоящей работе с помощью метода шшивок, прямых УФ-индуцированных либо с использованием 2-иминотиолана или метиленового голубого, впервые показано, что в формирование участка связывания SBP2 на рибосоме вовлечена 28S рРНК. Для белка р40 установлено, что его содержание в препаратах 40S субчастиц рибосом из плаценты человека может варьировать. Для выяснения способности р40 связываться с субчастицами использовали субчастицы с дефицитом этого белка и рекомбинантный белок р40 или его укороченные формы. Показано, что делеция С-концевого домена р40 приводит к полной потере его способности связываться с рибосомами. Субчастицы рибосом, содержащие белок р40 в эквимольном количестве, связывались с IRES-элементом вируса гепатита С (IRES HCV) значительно эффективнее, чем субчастицы с низким содержанием этого белка, причем семикратное уменьшение содержания белка приводило к пятикратному снижению величины K_d IRES HCV с 40S субчастицами. Последнее указывает на ключевую роль этого белка в формировании участка связывания IRES HCV на 40S субчастице.

Работа поддержана грантом РФФИ 08-04-00593а.

Изучение конформационной гибкости коротких одно- и двухцепочечных ДНК-олигонуклеотидов несущих поврежденные нуклеотиды методом ЭПР

Кузнецов Н. А.¹, Милов А. Д.², Самойлова Р. И.², Дзюба С. А.²,
Коваль В. В.¹, Федорова О. С.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Институт химической кинетики и горения СО РАН, Новосибирск*

Повышающийся уровень загрязнения окружающей среды, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение приводят к повреждению геномной ДНК. Окисление, алкилирование, дезаминирование, апуринизация/апиримидизация, образование разрывов цепей ДНК – это неполный спектр процессов, которые приводят к повреждению структуры ДНК. Основными продуктами окислительной модификации пуриновых оснований ДНК являются 8-оксогуанин и 2,6-диамино-4-окси-5-формамидопиримидиновые производные аденина и гуанина. Подобные повреждения генетического аппарата обладают цитотоксическим и мутагенным эффектом и способны приводить к развитию сердечнососудистых, нейродегенеративных и онкологических заболеваний.

Удаление остатков 8-оксогуанина из ДНК осуществляет фермент 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза. Несмотря на то, что в настоящее время химический механизм реакций, осуществляемых этим ферментом в клетках различных организмов, установлен, все еще неизвестно, каким образом фермент «находит» единичные повреждения азотистых оснований ДНК среди огромного числа немодифицированных оснований. В нашей работе в 12-звенные одно- и двухцепочечные олигонуклеотиды, несущие в середине одной из цепей поврежденный нуклеотид (2-гидроксиметил-3-гидрокситетрагидрофуран и бис-(диэтиленгликоль) фосфат) вводили на 3'- и 5'-концы спиновые метки ТЕМРО (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил). С помощью метода ЭПР (PELDOR) получены спектры расстояний между спиновыми метками, определены значения средних расстояний между метками и ширины спектров расстояний. Показано, что образование дуплексов приводит к значительному сужению спектра расстояний по сравнению со спектрами одноцепочечных ДНК. Введение поврежденного либо модифицированного нуклеотида уменьшает среднее расстояние между спиновыми метками для дуплексов вследствие изгибания дуплекса вокруг области вставки. Полученный результат может иметь значение для понимания механизмов поиска поврежденных нуклеотидов в ДНК ферментами репарации.

Работа выполнена при поддержке Интеграционного проекта СО РАН № 48, грантов РФФИ (№ 07-04-00191, 08-04-12211), грантов Президента РФ (НШ-652.2008.4, МК-987.2008.4), госконтракта № 02.740.11.0079.

**Рекомбинантные антитела человека, обладающие ДНК-азной активностью:
подходы к получению**

Морозова В.В.¹, Дубровская В.В.¹, Габибов А.Г.², Тикунова Н.В.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Институт биоорганической химии РАН, Москва*

Известно, что аутоиммунные патологии приводят к возникновению в организме каталитических антител различной специфичности. Одним из способов изучения и характеристики антител человека является создание комбинаторных фаговых библиотек фрагментов антител (scFv или Fab-фрагментов). Ранее на основе м-РНК лимфоцитов периферической крови больных рассеянным склерозом была создана аутоиммунная фаговая библиотека одноцепочечных антител. Полученная поликлональная популяция антител проанализирована нами на наличие ДНК-гидролизующей активности. В качестве контроля была использована неиммунная библиотека одноцепочечных антител человека, созданная на основе м-РНК лимфоцитов периферической крови здоровых доноров. Популяция антител, выделенных из аутоиммунной библиотеки, в отличие от популяции антител, выделенных из неиммунной библиотеки, проявила ДНК-гидролизующую активность. В дальнейшем было проведено обогащение аутоиммунной библиотеки ДНК-связывающими антителами с помощью Zn-хелатной хроматографии. При этом уровень ДНК-гидролизующей активности резко возрос по сравнению с исходной аутоиммунной библиотекой. Таким образом, с помощью методологии фагового дисплея подтверждено наличие в крови пациентов с рассеянным склерозом аутоантител, обладающих ДНК-гидролизующей активностью.

Каталитически активные антитела крови больных клещевым энцефалитом

Пархоменко Т.А.^{1,2}, Бунева В.Н. ^{1,2}, Невинский Г.А.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

Антитела с различными каталитическими активностями (абзимы) обнаружены при ряде аутоиммунных заболеваний: системная красная волчанка, рассеянный склероз, тиреоидит Хашимото и др., а также при некоторых вирусных инфекциях: гепатит, ВИЧ-инфекция. Выяснение сходств и различий причин и путей происхождения аутоиммунных процессов при вирусных и аутоиммунных заболеваниях необходимо для установления биологической роли абзимов при этих патологиях.

Целью данной работы являлось исследование каталитически активных АТ из крови больных клещевым энцефалитом.

Выделено 15 препаратов иммуноглобулинов класса G из сыворотки крови больных клещевым энцефалитом и определены их относительные ДНК-гидролизующие активности. Продемонстрировано выполнение критериев доказательства принадлежности каталитической активности непосредственно антителам (электрофоретическая гомогенность, гель-фильтрация в условиях «кислого шока», аффинная хроматография на анти-L сефарозе).

Проведено разделение суммарного препарата АТ аффинной хроматографией на ДНК-целлюлозе и измерены удельные ДНК-гидролизующая и амилитическая активности полученных фракций. Показано, что абзимы крови больных клещевым энцефалитом гетерогенны по сродству к ДНК-целлюлозе, причем их удельная каталитическая активность увеличивалась с повышением сродства антител к сорбенту. Наличие у антител, имеющих сродство к ДНК, амилитической активности объясняется тем, что с ДНК-сорбентом могут связываться АТ к полисахаридам, которые обычно перекрестно реагируют с ДНК.

Проведено исследование металл-зависимости реакции гидролиза ДНК препаратами IgG. Показано, что для всех исследованных образцов наиболее эффективными активаторами являются ионы Mn^{2+} , а ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} активировали гидролиз в меньшей степени, ионы других металлов (Co, Ni, Cu, K, Na) не оказывали активирующего эффекта.

Работа поддержана грантами Программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» № 21.16 и «Молекулярная и клеточная биология» № 22.7, а также РФФИ №№ 09-04-00804, 08-04-90014_Бел, Аналитической ведомственной целевой программой «Развитие научного потенциала высшей школы» № 2.1.1/5580 и Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 98.

Микробиологические подходы к проблеме дисбактериоза кишечника после билиопанкреатического шунтирования

Анищенко В. В.¹, Семенов С. А.¹, Хальзов А. В.¹, Шмакова Е.А.¹, Саранина И.В.²,
Антонова Т.Л.², Козлова Ю.Н.², Репин В.Е.²

¹ *Дорожная клиническая больница ОАО «РЖД», Новосибирск*

² *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

Одной из проблем в послеоперационном периоде у пациентов с выполненным билиопанкреатическим шунтированием (БПШ) по поводу ожирения является дисбактериоз (дисэнтеробиоз) кишечника

Каждый третий пациент в послеоперационном периоде отмечает резко выраженное брожение, метеоризм, крайне неприятный гнилостный запах фекалий. Основной причиной дисэнтеробиоза считается наличие в просвете толстой кишки большого количества крахмала и жиров вследствие шунтирования. «Избирательная» антибиотикотерапия не имела успеха, и, более того, приводила к усилению проявлений дисбактериоза, при этом исчезновения метеоризма и гнилостного запаха не было отмечено.

Всем пациентам (N=48) до операции и в послеоперационном периоде выполнялись стандартные посевы на дисбактериоз, из этой группы в 3 случаях в послеоперационном периоде выделялись гемолитические *E. coli* в большом титре, и еще в двух выделены простейшие, но в подавляющем большинстве соответствия клинической картины и полученных результатов не было. Анализ мазков при БПШ из просвета двенадцатиперстной кишки среднего и терминального отдела тонкого кишечника, из просвета желудка, толстого кишечника показал, что у 30% из посевов, взятых из терминальных отделов тонкой кишки выделена гемолитическая *E. coli*, стрептококки, микрококки и отмечено наличие низкого титра факультативных анаэробов. Эффект коммерческих пробиотиков и эубиотиков на выделенные штаммы минимален или отсутствует. Штаммы отличались высокой устойчивостью к традиционно применяемым антибиотикам и требуют индивидуального подхода. Разработана методика подбора бактериофагов литического действия к каждому набору штаммов, выделенному из пациентов. Для преодоления феномена рестрикции-модификации применяется двойная наработка бактериофагов.

В настоящее время решается задача применения штаммов бактериофагов и комбинации с терапией эубиотиками для регуляции процессов превалирующего роста факультативных анаэробов и газообразующей микробиоты, при этом получены первые положительные результаты.

Работа частично поддержана грантом 32, программы 21 «Фундаментальные науки – медицине»

Каталитическая полиреактивность иммуноглобулинов молока человека

Седых С.Е., Невинский Г.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Иммуноглобулины, которые неспецифически взаимодействуют с различными по химической природе антигенами и лигандами, называют полиреактивными. Например, антитела против ДНК при иммуноферментном анализе дают положительную реакцию на некоторые фосфолипиды, белки и другие полимеры полианионной природы.

В настоящей работе впервые исследована каталитическая полиреактивность природных абзимов (каталитически активных антител). Электрофоретически гомогенные IgG и sIgA молока человека были разделены аффинной хроматографией на большое число фракций, отличающихся по сродству к ДНК и АТФ. Все фракции иммуноглобулинов молока человека, элюированные с ДНК-целлюлозы и АТФ-сефарозы, проявляли каталитические активности в реакциях гидролиза ДНК плазмиды, АТФ, олигосахарида, а также фосфорилирования прочно связанных с иммуноглобулинами липидов и олигосахаридов. Наблюдалось распределение всех активностей по всему профилю хроматографии в случае каждого из сорбентов. Пики, соответствующие различным исследованным активностям полностью или частично перекрывались.

Ранее показано, что природные каталитически активные иммуноглобулины могут с определенной эффективностью связывать большое число различных лигандов. В данной работе впервые показана каталитическая полиреактивность антител. Однако ферменты катализируют в основном только один тип химической реакции, реализуемый только в случае специфического субстрата. Все неспецифические лиганды могут связываться с ферментами, выступая в качестве ингибиторов, активаторов или нейтральных по отношению к ферменту соединений, но не подвергаются превращению.

Полученные данные указывают на каталитическую гетерогенность и полиреактивность природных абзимов молока человека. Возможным механизмом происхождения каталитической полиреактивности IgG может быть обмен Fab-фрагментами или легкими цепями, в случае sIgA вероятно также образование химерных молекул из мономеров IgA с различными активными центрами.

Работа поддержана грантами Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» № 21.16, РФФИ № 07-04-00387, Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 98 и проектом СО РАН со сторонними организациями (ТИБОХ ДВО РАН) № 111.

Взаимодействие лактоферрина молока человека с ДНК

Соболева С.Е.^{1,2}, Гущина Т.А.¹, Невинский Г.А.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

Лактоферрин (ЛФ) – железосвязывающий гликопротеин, содержащийся в различных секреторных жидкостях организма. Белок характеризуется уникальным набором биологических функций. Белок проявляет антибактериальные, противовирусные и антигрибковые свойства, причем значительно увеличивает активность антибактериальных агентов и противогрибковых препаратов, а также обладает различными ферментативными активностями. Кроме того, лактоферрин взаимодействует с ДНК и РНК, полисахаридами, гепарином; некоторые из своих функций белок проявляет в виде комплексов с этими лигандами. Для понимания возможных причин исключительной полифункциональности лактоферрина необходимо детальное изучение процесса взаимодействия белка с такими жизненно важными молекулами, как полисахариды, ДНК и РНК, поскольку ДНК-зависимые ферменты играют важную роль в ключевых биологических процессах.

Целью настоящей работы является детальный анализ влияния неспецифических олигодезоксирибонуклеотидов (ODN) на комплексообразование гомогенных препаратов ЛФ со специфическим олигонуклеотидом (TAGAAGATCAAA). Показано, что минимальным лигандом ЛФ является ортофосфат. Белок эффективно взаимодействует с 8–12 звеньями неспецифического олигонуклеотида, расположенными в пределах белковой глобулы. Увеличение длины неспецифических ODN на одно звено приводит к возрастанию их сродства к белку в 1,92–2,35 раз, а основной вклад в сродство одноцепочечных олигонуклеотидов к ЛФ вносят слабые электростатические взаимодействия. В то же время ЛФ хуже взаимодействует с более гидрофобными $d(pA)_n$, чем с менее гидрофобными $d(pC)_n$ и $d(pT)_n$; следует полагать, что во взаимодействии белка с основаниями неспецифические гидрофобные контакты не участвуют. Добавление второй цепи к одноцепочечной ДНК приводит к возрастанию сродства на один порядок.

Работа поддержана грантами Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» № 21.16, РФФИ № 07-04-00387, Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 98 и проектом СО РАН со сторонними организациями (ТИБОХ ДВО РАН) № 111, Программой «Фундаментальные исследования и высшее образование» РФ (РНП.2.2.2.3.16036) и BRHE-fellowship 2007 (Y5-B-08-11).

**Анализ цитотоксического действия рекомбинантных аналогов потенциального
противоопухолевого пептида — лактапина на клетках человека**

Фомин А.С., Семенов Д.В., Кулигина Е.В., Коваль О.А., Бабкина И.Н., Тикунова Н.В.,
Матвеева В.А., Матвеев Л.Э., Рихтер В.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Ранее мы показали, что в человеческом молоке присутствуют белковые факторы способные вызывать апоптотическую гибель клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. С помощью ряда хроматографических подходов из молока был выделен, охарактеризован и идентифицирован один из таких белковых факторов — протеолитический фрагмент каппа-казеина человека с молекулярной массой 8 кДа -лактапин [1].

В данной работе сконструированы плазмиды, кодирующие рекомбинантные аналоги лактапина RL1 и RL2 (фрагменты каппа-казеина человека: с 66 по 134 и с 23 по 134 аминокислотных остатка соответственно) и созданы *E. coli* продуценты рекомбинантных аналогов этого белка. Проведен анализ действия рекомбинантных аналогов лактапина на культуры раковых клеток человека MCF-7, A549, Hep-2 и культуре мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека MSC.

Установлено, что инкубация клеток MCF-7, A549 и Hep-2 в присутствии рекомбинантного аналога RL2 приводила к существенному снижению их жизнеспособности (на 62%, 45% и 30% соответственно, 3 суток инкубации). Жизнеспособность клеток MSC при инкубации с RL2 не отличалась от контроля. Анализ распределения и стабильности рекомбинантного аналога лактапина RL2 в культуральной среде и в клетках MCF-7 показал, что RL2 эффективно взаимодействует с белками клеточной поверхности и проникает в цитоплазму клеток, после чего подвергается протеолитической деградации. Анализ субпопуляций MCF-7 проточной цитометрией показал, что при инкубации в присутствии RL2 в течение 72 ч. ~ 30% клеток погибали по механизму апоптоза. Установлено, что при этом происходит активация и каспазы-8 и каспазы-9. Эти данные позволяют заключить, что в апоптозе клеток MCF-7 под действием RL2 задействованы как митохондриальный, так и рецепторопосредованный пути.

1. Некипелая В.В., Семенов Д.В., Потапенко М.О., Кулигина Е.В., Кит Ю.Я., Романова И.В., Рихтер В.А. Доклады Академии наук. 2008. Т. 419. С. 268–271.

Работа поддержана грантом ФЦНТП № 02.512.11.2257.

Структурно-функциональные изменения в митохондриях гепатоцитов при экспериментальной дислиппротеидемии

Судаков Н.П.^{1,4,6}, Никифоров С.Б.¹, Клименков И.В.^{3,4}, Новикова М.А.^{1,4}, Липко С.В.⁵, Попкова Т.П.⁶, Клименко Е.С.², Константинов Ю.М.^{2,4}.

¹ Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН, Иркутск

² Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

³ Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

⁴ ГОУ ВПО Иркутский Государственный университет, Иркутск

⁵ Институт геохимии им. А.Н. Виноградова СО РАН, Иркутск

⁶ ГУЗ Иркутская ордена «Знак Почета» областная клиническая больница, Иркутск

Изучены структурно-функциональные нарушения митохондрий гепатоцитов при экспериментальном атеросклерозе (алиментарная модель дислиппротеидемии по методике Н.Н. Аничкова) на кроликах породы «Шиншилла» (135 сутки). У животных с моделью дислиппротеидемии наблюдали возрастание концентрации холестерина крови в 11,6 раз и увеличение коэффициента атерогенности в 41 раз в отличие от контрольной группы. Ультраструктурный анализ митохондриальной фракции животных с моделью дислиппротеидемии, в отличие от контроля, показал формирование в них дегенеративных изменений, характеризующихся фрагментацией крист (2 %), набуханием (0,5 %) и деструкцией (0,1 %) митохондрий. Внутри отдельных митохондрий (10%) наблюдаются миелоноподобные структуры, не характерные для группы контроля. Разработана система полуколичественного анализа уровня мтДНК в плазме и митохондриальных фракциях экспериментальных животных с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров к генам *сoсIII* и области D-петли. В настоящее время осуществляется поиск взаимосвязей наблюдаемых структурно-функциональных нарушений в митохондриях клеток печени и содержанием мтДНК в плазме крови. В пользу реальности разработки метода введения трансгенов в митохондрии с терапевтическими целями свидетельствует существование в митохондриях животных и человека природной компетентности к импорту ДНК.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

3-метил-6-(проп-1-ен-2-ил)циклогекс-3-ен-1,2-диол - новый высокоэффективный противосудорожный агент

Павлова А.В., Толстикова Т.Г., Волчо К.П., Ильина И.В., Ардашов О.В.

Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

Разработка новых высокоэффективных противосудорожных лекарственных веществ является одной из важнейших задач современной фармакологии. Учитывая наличие ценных фармакологических свойств гидроксипроизводных соединений *para*-ментанового ряда, в лаборатории лесохимии и химии природных биологически активных соединений НИОХ СО РАН исходя из распространенного монотерпеноида (-)-вербенола был синтезирован 3-метил-6-(проп-1-ен-2-ил)циклогекс-3-ен-1,2-диол и получены 25 его производных.

В результате проведенного первичного скрининга полученных соединений было показано, что 3-метил-6-(проп-1-ен-2-ил)циклогекс-3-ен-1,2-диол проявляет противосудорожное действие, возможно, связанное с влиянием агента на нейромедиаторные (ГАМК-ергическую, Н- и М-холинергическую) системы, вовлеченные в регуляцию судорожного ответа. В ходе экспериментов выявили, что наибольшую активность исследуемый агент проявляет в дозе 10 мг/кг при пероральном введении, сопоставимую с противосудорожной активностью препарата сравнения сибазоном. При уменьшении дозы исследуемого агента до 0,5 мг/кг сохранялась его высокая противосудорожная активность в тесте с коразолом, в то время, как ЭД₅₀ фенобарбитала и диазепама, применяющихся в качестве противосудорожных средств, в тесте «коразоловая токсичность» составляет 72 и 0,7 мг/кг соответственно. Кроме того, выбранный агент потенцирует действие предшественника дофамина, проявляя стимулирующее влияние на дофаминергическую систему, не оказывает влияния на психолокомоторную активность, проявляет стимулирующее действие на центральную нервную систему, сокращая длительность действия снотворных препаратов. Важным плюсом данного соединения является присущая ему низкая токсичность (LD₅₀ более 4000 мг/кг при пероральном введении, т.е. не менее чем в 7 и 8 раз ниже, чем среднесмертельная доза известных антиконвульсантов сибазона и карбамазепина соответственно, при аналогичном способе введения).

Обнаруженные свойства делают 3-метил-6-(проп-1-ен-2-ил)циклогекс-3-ен-1,2-диол перспективным для разработки нового полифункционального лекарственного препарата для лечения судорожных расстройств.

Динамика экспрессии генов при формировании долговременной посттетанической потенциации в срезах гиппокампа крыс

Соколова О.О., Штарк М.Б., Лисачев П.Д., Пустыльняк В.О.

НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск

Долговременная посттетаническая потенция (ДПТП) является классической моделью для исследования механизмов нейрональной пластичности. Эти механизмы необходимо учитывать при разработке психотропных лекарственных препаратов, в первую очередь – антидепрессантов и анализе их действия. Речь может идти, например, об открытии сигнальных путей, активируемых антидепрессантами, и действующих через экспрессию генов.

Критическое событие, приводящее к индукции ДПТП, – увеличение концентрации ионов кальция в постсинаптической клетке. Это увеличение запускает серию биохимических каскадов, ведущих к разворачиванию генетических программ, лежащих в основе стабильных долговременных изменений фенотипа нейронов. Индукция ДПТП сопровождается секрецией нейротрофических факторов, в частности, глиального кальцийсвязывающего белка S100B, участвующего в кальциевом гомеостазе и регуляции нейрональной пластичности. Концентрация этого белка значительно увеличена в плазме, цереброспинальной жидкости и моче при многих нейропатологиях (травматическое повреждение мозга, болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, шизофрения).

Используя метод ПЦР в реальном времени, мы исследовали содержание мРНК S100B, S1006, S100A1 и ряда транскрипционных факторов (egr-1, junB, c-jun, c-fos) через 30, 60 и 120 мин после формирования ДПТП в поле CA1 срезов гиппокампа крыс. Мы обнаружили значительное (в 2-4 раза) увеличение содержания мРНК S100B в срезах уже через 30 мин после тетанизации, затем ее количество постепенно возвращалось к уровню контроля. Содержание мРНК S100A1, наоборот, нарастало постепенно в течение часа и сохранялось на этом уровне следующий час. Что же касается S100A6, то содержание его мРНК не отличалось от контроля во всех исследованных временных точках.

Механизмы увеличения уровня мРНК S100B и S100A1 (увеличение генетической экспрессии или снижение скорости деградации) пока неясны. Характер причинно-следственной связи между активацией секреции и увеличением содержания мРНК этих белков также требует уточнения. Дальнейшее исследование обнаруженного явления расширит наши представления о механизмах нейро-глиальных взаимодействий при формировании ДПТП.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 09-04-00-200-а.

**Новые материалы и технологии
в клинической медицине**

**Новые подходы к организации внутриведомственного контроля качества
медицинской помощи в многопрофильном стационаре**

Александрова И.Б.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск*

Врачебная комиссия учреждения в связи с выходом приказа МЗ и СР РФ № 513н от 24.08.2008 «Об утверждении положения о врачебной комиссии медицинской организации» должна рассматриваться как орган управления и контроля качества медицинской помощи.

Стандартизация медицинской помощи при этом является одним из способов улучшения ее качества, сохранения финансовых ресурсов учреждения и медицинского страхования, и безусловно должна быть использована при ее оценке.

Ежемесячный мониторинг показателей качества и доступности медицинской помощи каждого профильного отделения стационара, его анализ с последующим принятием управленческих решений может быть использован для достижения плановых статистических показателей учреждения.

При оценке уровня качества медицинской помощи учреждения все большее значение приобретает удовлетворенность пациента.

Хирургическое лечение переломов луча в «типичном месте» у пожилых пациентов

Ангельский А.А.

Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск

Повреждения лучевой кости в «типичном месте» является наиболее часто встречающимся переломом среди всех повреждений скелета. Для лиц пожилого и старческого возраста, по данным разных авторов, они составляют до 70% всех переломов. Данное повреждение встречается в 10-11 раз чаще у женщин, чем у мужчин. В этом возрасте при инволютивном остеопорозе эти переломы носят, как правило, нестабильный, оскольчатый и внутрисуставной характер, затрагивающий две или три костные колонны лучезапястного сустава. В настоящее время наиболее часто принято лечить переломы лучевой кости проведением закрытой репозиции с фиксацией в гипсовой или полимерной повязке, однако вторичные смещения отломков, развитие нейротрофических осложнений побуждают чаще применять хирургическое лечение. Применение аппарата Илизарова у пожилых людей не всегда желательно из-за затруднений с уходом за спицами. Поэтому достаточно большое распространение получает метод погружного остеосинтеза спицами или пластинами. Использование волярных блокированных пластин позволяет осуществлять более точную репозицию отломков, восстанавливая суставные взаимоотношения и надежно удерживать отломки до сращения и на весь период реабилитации пациентов.

В отделении травматологии и ортопедии ЦКБ СоРАН в течении последних 3 лет проводилось активное оперативное лечение переломов луча в «типичном месте» при нестабильных повреждениях у пожилых пациентов. Всего прооперировано 22 пострадавшего старшего возраста: 19 было женщин и 3 мужчин. Средний возраст пациентов составил от 60 до 89 лет. В 4 случаях проводилась фиксация спицами, у 17 пациентов проводилась фиксация волярными пластинами различных модификаций, в 1 случае проводилась тыльная фиксация кривой Т-образной пластиной. Отмечено что применение спиц требовало дополнительной внешней иммобилизации, что отодвигало реабилитационный этап на 2–4 недели. Применение погружного остеосинтеза с помощью волярных блокированных пластин с угловой стабильностью позволяло начать реабилитацию практически через 3–5 дней после оперативного вмешательства. У многих пациентов к моменту снятия швов, на 10–12 сутки после оперативного вмешательства частично восстанавливалась функция лучезапястного сустава. Ни в одном случае мы не получили гнойных осложнений после хирургического вмешательства.

Электронный нос как средство неинвазивной диагностики

Петровский Д.В.¹, Шнайдер Е.П.², Шевела А.И.³, Бабко А.Н.³,
Куликов В.Г.³, Мошкин М.П.^{1,2}.

¹ *Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск*

² *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

³ *Центр Новых Медицинских Технологий, ИХБиФМ СО РАН, Новосибирск*

Последнее время огромное внимание уделяется использованию выдыхаемого воздуха для диагностики различных патологий у человека. Анализ проводится при помощи хроматомас-спектрометрии либо специально разработанных высокоселективных сенсоров. Наряду все большее распространение получают аналитические устройства, объединяемые названием «электронный нос», которые имитируют структурно-функциональную организацию обонятельных систем животных. Эти устройства представляют набор низко селективных детекторов, обладающих высокой перекрестной чувствительностью. Типы сенсоров и их количество может быть различным. Использование многомерного статистического анализа позволяет с известной точностью дифференцировать сложные запаховые смеси. Одним из таких приборов является Bloodhound ST 214 (Scensive Technologies Ltd.), который содержит матрицу из 13 токопроводящих полимерных датчиков. Ответ каждого датчика описывается четырьмя параметрам.

Мы проверили возможность использования этого электронного носа для диагностики зараженности пациентов *Helicobacter pylori* на основе анализа выдыхаемого воздуха. Воздух собирали дважды: до и через 5 минут после приёма 25 мл 2% раствора мочевины. Референтную оценку инфицированности проводили с помощью цитологического исследования биоптатов слизистой желудка. Обследовано 34 человека, 9 из них были инфицированы *H. pylori*. Для дифференцирования зараженных и незараженных пациентов использовали линейный дискриминантный анализ. Правильность предсказания зараженности проверяли путем последовательного исключения одного из результатов из обучающей выборки. Показано, что вероятность правильного предсказания последовательно возрастала при анализе выдыхаемого воздуха до приема мочевины, после приема мочевины и всей совокупности данных: 66% ($p > 0.5$); 89% ($p < 0.01$) и 100% ($p < 0.001$) соответственно.

Учитывая наш опыт, а также экспериментально обоснованную возможность диагностики других заболеваний с помощью Bloodhound ST 214 (Pavlou et al., 2002; Fend et al., 2005), можно заключить, что универсальные электронные носы в ближайшем будущем найдут широкое применения в качестве многоцелевого диагностического средства.

Особенности распределения генотипов по двум SNP в гене *PMS2*

Бабушкина Н.П., Кучер А.Н.

НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск

Эндонуклеаза, кодируемая геном *PMS2*, является компонентом системы пост-репликативной мисс-матч репарации (MMR), BRCA1-ассоциированного комплекса наблюдения за геномом и белкового комплекса RAD50-MRE11-NBS1. Протеин *PMS2* вовлечен также в сигнальный путь, вызывающий остановку клеточного цикла и апоптоз при сильных повреждениях ДНК [1]. Мутации в *PMS2* могут приводить к ряду наследственных онкологических заболеваний [2, 3].

Для 160 человек в гене *PMS2* методом ПДРФ-анализа изучены rs1805321 и rs1059060 (BstMA I и Bse I I соответственно), не ассоциированные с какой-либо патологией. Для обоих локусов установлено отклонение наблюдаемого распределения генотипов от ожидаемого при равновесии Харди-Вайнберга. Для варианта rs1805321 отклонение от равновесия ($\chi^2=56$; $p<0,001$) было обусловлено тем, что при общем высоком уровне полиморфизма и встречаемости генотипов СС (25,6%) и СТ (74,4%) не выявлялись гомозиготы ТТ. Выборочное секвенирование гетерозигот по варианту rs1805321 подтвердило результаты ПДРФ-анализа. По rs1059060 отклонение от равновесия Харди-Вайнберга ($\chi^2=87$; $p<0,001$) наблюдалось из-за высокой частоты встречаемости гетерозигот (86,9%) и низкой — гомозигот АА (5,0%) и GG (8,1%). Сцепления между исследованными SNP не выявлено ($D=+0,014\pm 0,019$; $\chi^2=0,57$; d.f.=1).

Аналогичная ситуация показана и для других популяций мира: отмечалось отклонения от равновесия Харди-Вайнберга; частоты встречаемости обоих аллелей были близки к 0,5, при этом по rs1805321 генотипы ТТ встречались в единичных случаях, по rs1059060 — при высокой частоте регистрации гетерозигот редки оба типа гомозигот [4]. Исследованные SNP являются несинонимичными: rs1059060 в экзоне 14 приводит к замене Asn775Ser в консервативном Mut-L-C-терминальном домене димеризации; rs1805321 в экзоне 11 — к замене Pro470Ser, которая не относится к какому-либо известному домену *PMS2*. Функциональную значимость данных полиморфных вариантов предстоит выяснить в дальнейших исследованиях, однако, как отсутствие гомозигот ТТ для rs1805321, так и существенное преобладание гетерозигот для rs1059060 заставляет предполагать функциональную значимость этих SNP на ранних этапах онтогенеза.

1. Sacho E.J. et al. //Mol Cell. 2008. V. 29. P. 112–121.
2. Hamilton S.R et al. // N Engl J Med. 1995. V. 332. P. 839–847.
3. De Vos M et al. // Am J Hum Genet. 2004. V. 74. P. 954–964.
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Полиморфизм генов интерлейкинов на разных этапах онтогенеза человека

Бабушкина Н.П., Чепя М.В., Бычкова О.Ю., Назаренко М.С., Кучер А.Н.

НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск

Иммунная система во многом определяет протекание заболеваний на протяжении всего периода онтогенеза человека. Генетическая компонента, обуславливающая особенности иммунитета, остается неизменной на протяжении всей жизни организма, поэтому представляется актуальным изучение полиморфизма генов иммунной системы в «крайних точках» онтогенеза, а именно — у спонтанно абортированных эмбрионов («отсеянных» из популяции в результате естественного отбора) и у долгожителей (прошедших максимальное число этапов отбора) в сравнении с выборкой лиц репродуктивного возраста (контрольная группа).

Изучены 7 SNP в четырех генах интерлейкинов и их рецепторов: *IL4RA* (rs1801275, rs2074570), *IL12A* (rs568408), *IL12B* (rs3212227, rs3212220), *IL12RB1* (rs3746190, rs11575926) в образцах ДНК долгожителей (96 образцов), популяционного контроля (96 образцов) и спонтанных абортусов первого триместра беременности (98 образцов с нормальным кариотипом). Национальный состав выборок однороден — представлен русскими жителями г. Томска (все обследованные и родители погибших эмбрионов).

Сравнение группы спонтанных абортусов и с долгожителями и с контролем не выявило статистически значимых различий по частотам аллелей и генотипов исследованных SNP. Между группой долгожителей и контролем различия показаны для локуса *IL4RA* (rs1801275) по частотам аллелей ($\chi^2=8,3$, $df=1$, $p<0,05$) и генотипов ($\chi^2=8,2$, $df=2$, $p<0,05$) и для локуса *IL12B* (rs3212220) по частотам генотипов ($\chi^2=6,7$, $df=2$, $p<0,05$). Предрасполагающими к увеличению продолжительности жизни являются: в гене *IL4RA* аллель G (OR=2,2; CI=1,27-3,90; $p<0,05$) и совокупность генотипов GG и AG (OR=2,4; CI=1,23-4,69; $p<0,05$); в гене *IL12B* — генотип TT (OR=5,9; CI=1,19-40,01; $p<0,05$). Для rs1801275 в гене *IL4RA*, приводящей к замене аминокислоты Q551R, известны ассоциации с рядом мультифакториальных патологий [1, 2]. rs3212220 (интрон 1 гена *IL12B*), предположительно, модифицирует сайт связывания транскрипционных факторов. С учетом функциональной значимости изученных SNP, полученные данные могут свидетельствовать о вовлечении полиморфизма генов интерлейкинов и их рецепторов в определении продолжительности жизни человека.

1. Schwartzbaum J. et al. // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007. Vol. 16. P. 2448 – 2454.
2. Prots I. et al. // Arthritis Rheum. 2006. Vol. 54. P. 1491 - 1500.

Частота мутации гена BRAF V600E(T1799A) при папиллярной карциноме щитовидной железы в Сибирском регионе России

Буравлева Е.Ю.¹, Малахина Е.С.¹, Храпов Е.А.¹, Филипенко М.Л.¹,
Шевченко С.П.², Лифшиц Г.И.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН Новосибирск*

² *МБУЗ г.Новосибирска ГКБ№ 1*

Актуальность. Рак щитовидной железы — наиболее частая опухоль эндокринной системы. Наиболее распространенным морфологическим вариантом рака щитовидной железы является папиллярная карцинома — 75% от всех случаев заболевания. Диагностика гиперпластических и опухолевых процессов в щитовидной железе затруднена. В связи с этим уделяется большое внимание различным молекулярным маркерам, характеризующим биологические свойства опухоли. Соматическая мутация в гене BRAFV600E(T1799) расценивается, как наиболее распространенный молекулярный дефект при спорадической папиллярной карциноме (39–83%), характеризует более агрессивное течение заболевания.

Цель. Разработка метода выявления с помощью «real-time» ПЦР и исследование частоты соматической мутации гена BRAFV600E(T1799A) при папиллярной карциноме щитовидной железы в Западно-Сибирском регионе России.

Материалы и методы. Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили 106 аспириата из узловых образований щитовидных желез, полученные при ТАБ под контролем УЗИ, 34 интраоперационных биоптатов папиллярного рака. Соматическую мутацию BRAFV600E определяли методом двунаправленной аллель-специфичной амплификации с детекцией результатов в режиме реального времени («real-time» ПЦР), ПДРФ-анализом (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) продуктов полимеразной цепной реакции специфического участка гена BRAF. Результаты анализа верифицировали прямым секвенированием полученных фрагментов ПЦР.

Результаты и выводы. Всего обследовано 140 пациентов. В группу пациентов с папиллярной карциномой включили 11 больных с установленным цитологическим диагнозом и 34 пациента с гистологическим диагнозом папиллярная карцинома. Группу контроля составили 95 человек с прочими вариантами (фолликулярная опухоль — 20,4%, медулярная карцинома — 2%, тиреоидит Хашимото — 9,7%, коллоидный зоб — 61,2%). В группе папиллярной карциномы частота мутации BRAFV600E составила 50%. В нашем исследовании соматическая мутация BRAF не определена ни в одном случае других видов опухолей щитовидной железы. Показано, что метод выявления мутации BRAFV600E с помощью «real-time» ПЦР обладает высокой специфичностью и чувствительностью.

Сравнительная характеристика структуры больных бронхиальной астмой в динамике наблюдения (по данным 2 терапевтического отделения за 2001 - 2008 годы)

Ганюкова Н.Г.^{1,2,3}, Солдатова Г.С.^{1,2,3}

¹ *Центральная клиническая больница СО РАН,*

² *Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск*

³ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

Бронхиальная астма является серьезной социальной проблемой, в мире ею болеют более 300 млн человек, но в последние годы отмечен значительный прогресс в диагностике и лечении бронхиальной астмой.

Цель: изучить динамику структуры, лечения и качества жизни больных бронхиальной астмой вследствие широкого применения ингаляционных глюкокортикостероидов.

Материалы и методы: в соответствии с целями проведен анализ историй болезни пациентов бронхиальной астмой, прошедших лечение во 2 терапевтическом отделении ЦКБ СО РАН в 2001 (163 человека) и 2008 годах (111 больных) .

Результаты: отмечены положительные качественные тенденции в структуре, подходах к лечению этих больных: уменьшение общего количества пациентов, нуждающихся в стационарном лечении, несмотря на высокий показатель тяжелых форм заболевания (38% от общего количества в 2001 году и 42% - в 2008 году), достоверно меньшее число больных с гормонозависимой бронхиальной астмой (42% в 2001 году и 17% в 2008 году), более частое использование современных ингаляционных глюкокортикостероидов.

Выводы: Современная терапия больных бронхиальной астмой ингаляционными глюкокортикостероидами имеет высокую клиническую эффективность, отсутствие необходимости госпитализаций и приводит к улучшению качества жизни этих пациентов.

Ассоциация полиморфных вариантов генов гемостаза с предрасположенностью к атеротромбозам и показателями периферического гемостаза у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями

Лифшиц Г.И.^{1,2}, Данилкина С.Т.^{1,2}, Филиппенко М.Л.¹,
Воронина Е.Н.¹, Гуськова Е.В.³

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Центр новых медицинских технологий, Новосибирск*

³ *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

Атеротромбоз является причиной более 28% всех случаев смерти в мире. Его распространенность нарастает, что отражается в резком повышении частоты инфарктов и инсультов [1].

Атеротромбоз играет существенную роль в патогенезе атеросклеротического поражения артерий. К генам-кандидатам, определяющим развитие атеротромбоза, можно отнести группу генов, кодирующих белковые факторы системы гемостаза.

Целью работы явилось изучение ассоциации полиморфных вариантов генов плазменного звена гемостаза — факторов свертывания крови II (F2), V (F5), фибриногена (FBG);

генов тромбоцитарных рецепторов — тромбоцитарных мембранных гликопротеинов Iа (GpIа), Iβ (GpIβ), IIIа (GpIIIа);

генов системы фибринолиза — ингибитора активатора плазминогена первого типа (PAI-1); с функциональными особенностями системы гемостаза и развитием атеротромбоза у пациентов с ССЗ, жителей г. Новосибирска.

В исследование включены 76 последовательных пациента с ССЗ (ИБС, АГ). В первую группу вошли 39 пациента с атеротромбозом (ИМ, мозговой инсульт в анамнезе); во вторую группу — 37 пациентов без атеротромбоза. У 40 больных были исследованы параметры системы гемостаза. Определение аллелей полиморфных вариантов генов гемостаза проводили методом ПЦР-ПДРФ анализа.

В исследовании показано отсутствие связи между исследованными полиморфными вариантами генов гемостаза и наличием атеротромбоза. Показано отсутствие ассоциаций между полиморфными вариантами генов F5, F2, GpIа, GpIIIа, GpIβ, FBG и функциональными особенностями системы гемостаза в выборке пациентов с ССЗ. Была найдена ассоциация вариабельности концентрации плазминогена между различными полиморфными вариантами 4G(-675)5G гена PAI-1 у больных ССЗ. У носителей генотипов 4G/4G и 4G/5G наблюдалась более низкая исходная активность ПГ, тогда как для носителей генотипа 5G/5G была характерна максимальная исходная активность этого фактора ($p < 0,05$).

1. Атеротромбоз — проблема современности. Журнал Тромбоз, гемостаз и реология. 2000. № 1. С. 6–8.

Современные подходы к диагностике эндометриоза тела матки

Долгова Е.М.^{1,2}, Шевела А.И.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
² *Центр Новых Медицинских Технологий в Академгородке, Новосибирск*

Актуальность. В 7–50% случаев генитального эндометриоза выявляется поражение матки – аденомиоз, который диагностируется у 70–80% женщин детородного возраста. Развитие медицинских технологий позволили повысить точность диагностики аденомиоза, однако она остается недостаточной при I-II степени распространения.

Цель. Улучшение качества диагностики эндометриоза тела матки (ЭТМ) путем использования ультразвукового метода с потенцированным внутриматочным введением эхопозитивного контрастного средства.

Материал и методы. Ретроспективному анализу подвергнуты 265 последовательных клинических наблюдений: в I группу вошли 143 (53,9%) пациентки с ЭТМ или с подозрением на него и с сопутствующим бесплодием, к которым были применены контрастная гистеросонография (КГСГ) и контрастная гистеросальпингосонография (КГССГ). Во II группу вошли 122 (46,1%) пациентки с ЭТМ или с подозрением на него и с бесплодием, к которым было применено «рутинное» УЗИ. Для исследования использовались УЗ аппараты: 1) стационарный экспертного класса Voluson-730 Expert, GE Medical Systems – Kretztechnik GmbH & Co OHG (Австрия) с конвексными мультислотными датчиками – АВ 2-5 и 5-9 МГц абдоминального, RIC 5-9 МГц эндокавитального сканирования; 2) переносной среднего класса SSI-1000, SonoScape Company Limited, Китай, с конвексным С344 5-2 МГц/R40 mm и микроконвексным эндовагинальным 6V1 8-4 МГц/R11 mm датчиками. Для выполнения КГСГ и КГССГ применялись разработанный нами способ исследования состояния полых органов (патент № 2290067) и способ диагностики диффузных изменений миометрия (патент № 2307590).

Результаты и их обсуждение. Из 143 пациенток I группы ЭТМ был выявлен и подтвержден при КГСГ и КГССГ у 105 (73,4%). У 5 (3,5%) пациенток были диагностированы венозные интравазации. Из 122 пациенток II группы он был выявлению подтвержден на «рутинном» УЗИ только у 55 (45%).

Заключение. Применение КГСГ и КГССГ повышает информативность УЗ метода, а именно чувствительность с 63 до 94%, специфичность с 57 до 84%, диагностическую точность с 62 до 92% для выявления эндометриоза тела матки.

Эффективность применения соноэластографии в предоперационной диагностике рака щитовидной железы

Шевченко С.П.^{1,3}, Долгова Е.М.², Шевела А.И.², Куликов В.Г.², Махотин А.А.²

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

³ Отделение хирургической онкоэндокринологии МБУЗ ГКБ № 1, Новосибирск

Актуальность. В связи с ростом заболеваемости раком щитовидной железы (РЩЖ) особенно актуальны вопросы его диагностики на дооперационном этапе.

Цель. Оценить возможности соноэластографии (СЭГ) в предоперационной диагностике РЩЖ.

Материал и методы. УЗИ исследование с СЭГ проводилось на сканере HITACHI EUB 8500 линейным высокочастотным датчиком с частотой – 8–12 МГц пациентам с узловыми образованиями щитовидной железы в возрасте от 20 до 70 лет. Ретроспективному анализу подвергнуты 43 случая последовательных клинических наблюдений. Размеры узловых образований составили от 10 до 40 мм. В зависимости от результатов тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии (ТАПБ) после УЗИ с СЭГ все пациенты были разделены на 2 группы: I группа- 28 (65,1%) пациентов, которым оперативное лечение не показано (коллоидные узлы, узловатая форма АИТ и т.д.) и II группа – 15 пациентов (34,9%), которым оперативное лечение показано (аденома, дисплазия, подозрение на рак, рак). Все пациенты последней группы была прооперированы. При окончательном гистологическом исследовании выявлено: у 4 (26,7%) пациентов доброкачественные изменения, у 11 (73,3%) рак щитовидной железы. При СЭГ проводилась оценка коэффициента жесткости (КЖ) узловых образований. Во всех 11 случаях РЩЖ КЖ превышал 4. Среднее затратное время для проведения соноэластографии при УЗИ составило 6 минут.

Результаты и их обсуждение. Коллоидные узлы и АТИ (ложноузловатая форма) преимущественно окрашивались однородно в мягкие тона (зеленый цвет), в редких случаях неоднородно, но с преобладанием мягких тонов, с КЖ от 0,4 до 1,7–2. Доброкачественные изменения (аденома, пограничные состояния) окрашивались мозаично, с КЖ – 1,5 до 3,7. Злокачественные образования кодировались при СЭГ однородно в темные (синие цвета), при этом края образования в режиме соноэластографии и В- режиме могли и не совпадать (при СЭГ были больше), с КЖ более 4.

Выводы. СЭГ повышает диагностическую точность УЗД РЩЖ и качество наблюдения за пациентами с узловыми образованиями щитовидной железы. Значение КЖ > 4-х – высокоспецифичный эхографический СЭГ критерий РЩЖ.

Применение экстракорпоральной фармакокоррекции в лечении тяжелых гнойно-воспалительных заболеваний брюшной полости.

Дыдикова О.А.

*Центр Новых Медицинских Технологий ИХБФМ СО РАН, Новосибирск
Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск*

Цель работы: Оценить эффективность направленного транспорта антибактериальных препаратов при введении их с клеточной массой, полученной во время плазмафереза, в лечении тяжелых гнойно-воспалительных заболеваний брюшной полости.

Материалы и методы: Было обследовано и пролечено 24 больных со следующей патологией: деструктивный холецистит; панкреонекроз; аппендикулярный перитонит; абсцесс брюшной полости; мезентериальный тромбоз. Средний возраст больных $53,8 \pm 4,49$ лет. Состояние пациентов расценивалось как тяжелое и крайне тяжелое с оценкой по шкале АРАСНЕ II 0–30 баллов.

Все больные были разделены на две группы. Контрольной группе больных назначалась антибактериальная терапия из двух препаратов, в которые входил тиенам, в суточной дозе 2 грамма. Способ введения внутривенный. Вторая группа получала аналогичную терапию, но тиенам вводился с взвесью форменных элементов крови, полученных во время плазмафереза. Предварительно производилась инкубация клеточной взвеси и антибиотика с корректором связывания АТФ. Однократная доза тиенама 2 грамма, а интервал между операциями составлял 24 часа. Количество манипуляций зависело от тяжести процесса и варьировало от 2 до 6. Эффективность терапии оценивалась по температуре тела, количеству лейкоцитов, по длительности пребывания в больном в отделении реанимации и интенсивной терапии.

Результаты: На протяжении лечения у больных основной группы уменьшилось количество лейкоцитов на 5 сутки с $22,15 \cdot 10^9/\text{л}$, до $9,7 \cdot 10^9/\text{л}$. При этом в контрольной группе лейкоцитоз на 5 день составил $14,45 \cdot 10^9/\text{л}$. В основной группе мы наблюдали нормализацию температурной реакции к 3 суткам, тогда как в контрольной группе повышение температуры тела до субфебрильных и фебрильных цифр сохранялась до 5 дней. В группе больных, которым проводилось экстракорпоральная фармакокоррекция уменьшилась средняя длительность пребывания больных в ОРИТ с $8,91 \pm 1,2$ до $5,2 \pm 1,65$ койко-дня

Выводы: Таким образом, применение экстракорпоральной фармакокоррекции в лечении тяжелых гнойно-воспалительных заболеваний брюшной полости значительно повышает эффективность антибиотикотерапии. Это связано с увеличением концентрации антибиотика в очаге воспаления, что приводит к снижению риска гнойно-септических осложнений и, соответственно, сроков пребывания больного в ОРИТ.

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) и расстройства микроциркуляции у больных сахарным диабетом 2 типа

Рудницкая Т.А.^{1,2}, Кожин П.М.^{2,3}, Румянцева Н.В.¹, Колпаков М.А.^{1,2,3,4}

¹ Фонд «Медсанчасть-168», Новосибирск, ² НГУ, Новосибирск
³ НЦКЭМ СО РАМН, Новосибирск, ⁴ ЦНМТ в Академгородке, Новосибирск

Ретроспективные и проспективные исследования показывают тесную связь ГГЦ и сердечно-сосудистых заболеваний. Представляет интерес частота встречаемости ГГЦ у больных сахарным диабетом 2 типа и ее связь с расстройствами микроциркуляции.

Были обследованы 50 больных сахарным диабетом 2 типа (СД 2). Женщин – 28 человек, мужчин – 22, возраст от 47 до 75 лет. В контрольную группу вошли 23 условно-здоровых человека (11 женщин и 12 мужчин) в возрасте от 49 до 65. Концентрация гомоцистеина (ГЦ) измерялась иммуноферментным методом. Микроциркуляция оценивалась методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). Для коррекции ГГЦ назначался витаминный комплекс «Ангиовит» («Алтайвитамины», Бийск). Курс лечения проводился в течение двух месяцев.

Средний уровень ГЦ в сыворотке крови у лиц контрольной группы составил 8.8 мкмоль/л. Концентрация ГЦ у больных СД 2 была в 1.8 раз выше и статистически значимо отличалась от контрольной группы. ГГЦ с концентрацией ГЦ выше 11 мкмоль/л была выявлена у 64% обследованных больных. В группе условно-здоровых людей ГГЦ была выявлена лишь у одного обследованного из 23.

По данным ЛДФ-граммы, показатель микроциркуляции (ПМ) у больных СД 2 на 34% ниже, чем у здоровых обследованных. При проведении корреляционного анализа выявлена слабая отрицательная корреляционная связь между концентрацией ГЦ и ПМ.

Проведено лечение 25 пациентов с СД 2 и ГГЦ витаминами, они составили 1-ю группу, а 18 пациентам такое лечение не назначалось – они представили 2-ю группу сравнения. В первой группе после проведенной терапии концентрации ГЦ значительно снизились в среднем на 34%. У 85% пациентов на фоне лечения витаминами отмечилась достоверное снижение уровня ГЦ в крови. У 15% пациентов ГГЦ сохранялась. Перфузионный кровоток после проведенной коррекции ГГЦ достоверно увеличивался.

Результаты проведенных исследований указывают на необходимость мониторингования и коррекции ГГЦ витаминными комплексами, а также оценку микроциркуляции методом ЛДФ, так как он является неинвазивным, доступным и воспроизводимым.

Исследование поддержано грантами Президента Российской Федерации МД 2674.2008.7, мэрии Новосибирска (2008) и Новосибирской области (2008).

Предложен новый алгоритм диагностики конкрементов мочеточников

Кормилкин А.И.¹, Еркович А.А.², Шевела А.И.³, Махотин А.А.³

*¹Республиканская больница им. Г.Я. Ремиевской, Абакан, Республика Хакасия
²ИХиФМ СО РАН, Новосибирск, ³НГМУ, Новосибирск*

Повышение точности ранней неинвазивной диагностики причин, уровня и характера обструктивных уропатий (ОУ) — актуальная проблема урологии и лучевой диагностики. **Цель:** повышение точности и ценности УЗ метода в диагностике конкрементов мочеточников. **Материал и методы.** УЗИ производились мультисекторными конвексными датчиками: абдоминального и микроконвексными эндокавитального сканирования (ЭКС). Применялся алгоритм трансабдоминального сканирования (ТАС) дополненный ЭКС. Ретроспективному анализу подвергнуты 641 последовательных случаев почечной колики за период с 1997 по 2008 гг., где ТАС было дополнено ЭКС. Комплекс методов эталонного контроля: экскреторная урография (ЭУ), интраоперационная верификация, информация о камневыведении. **Результаты и обсуждение.** В 340 (52 %) случаях болевой синдром был обусловлен камнеотхождением. Конкременты задерживались в верхней трети мочеточников в 107 (31,5%), средней трети — в 34 (10%), в околопузырном отделе — в 130 (38%), в интрамуральном — в 69 (20,5%) случаях. При ТАС выявлено 62% конкрементов, при дополнении обследования методикой ЭКС в 93% случаев, в 31% конкрементов (конкременты нижней трети) выявлены только при ЭКС. В нижней трети мочеточника при ТАС в основном регистрировались конкременты интрамурального отдела, в то время как при эндокавитальном доступе дополнительно выявлялись конкременты околопузырного отдела. Лишь 1 из 10 конкрементов околопузырного отдела установлен при ТАС и 9 из 10 — при ЭКС. Среднее затратное время исследования составило 7 минут, время ожидания не превышало 50 минут. При сопоставимой с ЭУ и МСКТ точности, УЗ метод в предложенном алгоритме не несёт рисков инвазии, анафилактикоидных реакции, контрастиндуцированных нефропатий, стохастических эффектов лучевой нагрузки, доступен, выгоден, быстро выполняем, и, следовательно, является более ценной методикой в диагностике конкрементов мочеточников. **Выводы.** Дополнение ТАС ЭКС при ОУ повышает чувствительность УЗ метода в выявлении конкрементов мочеточников с 62 до 93%, специфичность — с 87 до 95%, диагностическую точность метода — с 80 до 96%. Диагностическая ценность УЗ метода в выявлении конкрементов мочеточников при применении алгоритма ТАС дополненного ЭКС выше, чем у ЭУ и МСКТ.

Исследование ассоциации полиморфизмов ряда генов с развитием осложнений беременности (гестоз, ПНБ)

Кох Н.В.¹, Воронина Е.Н.¹, Пасман Н.М.², Филипенко М.Л.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск*

² *Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск*

Вероятность возникновения патологии во время беременности, так же как и выраженность протекания, зависит от индивидуальных особенностей организма, а также от воздействия факторов внешней среды. Гестоз возникает при нарушениях в формировании адаптационных реакций, характерных для физиологического протекания беременности. Крайним проявлением нарушения адаптационных механизмов во время беременности может стать самопроизвольный выкидыш. Привычным невынашиванием беременности (ПНБ) называют прерывание беременности подряд два и более раз.

К генетическим факторам риска относятся аллельные полиморфизмы генов белков свертывания крови, ферментов детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантов, регуляторов артериального давления и др. [1, 2, 3, 4]. Однако эти данные требуют подтверждения ассоциаций на выборках различной этнической принадлежности.

Целью данной работы является исследование ассоциации полиморфных локусов генов *MTHFR*, *FII*, *FV*, *FGB*, *PAII*, *NOS*, *GPIIIa* с гестозом и ПНБ у жительниц Западно-Сибирского региона.

В ходе данного исследования был проведен анализ полиморфизма генов, перечисленных выше, у 464 женщины. Из них 105 пациенток с гестозом, 111 пациенток с ПНБ, 248 женщин — группа контроля без акушерской патологии.

В нашей работе выявлена ассоциация аллелей полиморфных локусов генов 677Т *MTHFR*, 20210А *FII*, 1691А *FV*, 4G675 *PAII* с развитием гестоза, а также аллелей полиморфных локусов генов 455А *FGB*, 20210А *FII* 1691А *FV*, 4G675 *PAII*, 4b VNTR *NOS* с ПНБ. Для аллелей полиморфных локусов 677Т *MTHFR* и 4G675 *PAII* обнаружен дозозависимый эффект: для гомозигот по данным аллелям риск акушерской патологии выше, чем для гетерозигот.

1. Sabine Mutze, Sabine Rudnik-Schoneborn. Genes and the preeclampsia syndrome // J. Perinat. Med. 36 (2008) 38–58.
2. Bloomenthal D, von Dadelszen P, Liston R, Magee L, Tsang P. The effect of factor V Leiden carriage on maternal and fetal health. JAMC 2002; 9, 167–173.
3. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340(1):9–13.
4. Kutteh WH, Triplett DA. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*. 2006 Feb; 24(1): 54–66.

Исследование генетической предрасположенности к развитию метаболического синдрома у жителей Западно-Сибирского региона

Кудрявцева Е.А., Воронина Е.Н., Филипенко М.Л., Лифшиц Г.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Метаболический синдром — многофакторное заболевание, которое в большинстве случаев проявляется лишь тогда, когда выражено влияние факторов окружающей среды [1]. В последние годы активно изучаются генетические факторы развития метаболического синдрома.

Целью данной работы является исследование роли аллельного полиморфизма генов *FTO*, *INSIG2*, *ADRB3*, *GNB3*, *ApoA5*, *PPAR α* , *TCF7L2*, *TNF β* и *LPL* в генетической предрасположенности при развитии метаболического синдрома у жителей Западно-Сибирского региона.

Определены частоты встречаемости аллелей и генотипов данных полиморфных локусов в выборке здоровых жителей Западно-Сибирского региона, а также больных метаболическим синдромом. Частоты встречаемости генотипов для всех исследуемых полиморфных локусов соответствовали закону Харди-Вайнберга.

Не обнаружено статистически значимых различий между частотами встречаемости аллелей и генотипов полиморфных локусов rs4994 гена *ADRB3* (Arg64Trp), rs5443 гена *GNB3*, rs8050136 гена *FTO* и rs3135506 гена *ApoA5* (Ser19Trp) в группах больных метаболическим синдромом и контрольной.

Носители аллеля G (GC+GG) полиморфного локуса rs1801282 гена *PPAR α* имеют меньший риск развития ожирения и гипертриглицеридемии. Также носители генотипа C/G имеют более высокий уровень глюкозы натощак по сравнению с носителями генотипа C/C.

Носительство аллеля T (T/T+T/C) полиморфного локуса rs7903146 гена *TCF7L2* ассоциировано с развитием висцерального ожирения.

Аллель G полиморфного локуса rs7566605 гена *INSIG2* является протективным фактором развития МС и висцерального ожирения.

Носители генотипа C/C полиморфного локуса rs328 гена *LPL* имеют более низкий индекс массы тела, чем носители генотипа C/G в группе больных метаболическим синдромом.

Аллель A полиморфного локуса rs1800629 гена *TNF β* является протективным фактором в отношении развития сахарного диабета 2 типа у больных метаболическим синдромом.

1. Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. Nature reviews genetics. 2008. N. 9(11). P. 819-830.

Алгоритм диагностики и лечения образований верхнего отдела ЖКТ

Куликов В.Г., Махотин А.А., Шевела А.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

У всех ведущих мировых специалистов не вызывает сомнений тот факт, что неудовлетворительные результаты диагностики и лечения язвенных и опухолевых процессов верхнего отдела ЖКТ связано с их поздней диагностикой. Одним из наиболее перспективных направлений в этой области считаем разработку новых и совершенствование уже известных методов. Десятилетиями, методами диагностики заболеваний ЖКТ остаются эндоскопические рентгенологические ультразвуковые. При эндоскопическом исследовании по ряду признаков можно получить достоверную информацию о состоянии поверхности слизистой, наличии дополнительных образований и правильно верифицировать диагноз путем забора материала на цито и гистологическое исследование. Однако ЭФГДС не дает представления о внутренней структуре измененной стенки, глубине инвазии процесса, метастазировании или прорастании в соседний орган. В последнее десятилетие внедрен метод эндоскопической ультрасонографии, сочетающий в себе достоинство гибковолоконной эндоскопии и ультразвукового исследования. Метод относительно экономичен, безвреден и высокоэффективен. Ультрасонография позволяет получать изображение пораженного органа в реальном масштабе и времени на протяжении всей процедуры, что немаловажно при оценке моторной функции органа. Соноэластография — метод, позволяющий оценивать плотность тканей, подверженных воспалительному или опухолевому процессам. При этом возможно с высокой точностью дифференцировать процесс с помощью определенных цифровых индексов. Фотодинамическая диагностика основана на спектрально-флюоресцентном методе и способности опухолевой клетки накапливать фотосенсибилизирующее вещество.

1. Лемешко З.А. Ультразвуковое исследование желудка, двенадцатиперстной кишки кишечника. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике / под ред. В.В. Митькова.
2. Соколов В.В. ФДТ диагностика заболеваний верхнего отдела ЖКТ. Клиническое руководство.

Новые подходы к диагностике женского бесплодия

Курганов С.А.^{1,2}, Попова В.В.²

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Центр Новых Медицинских Технологий в Академгородке, Новосибирск*

УЗИ на сегодняшний день стало доступным и более информативным благодаря использованию ультразвуковых контрастных средств. Цель: научно обосновать использование новых ультразвуковых контрастных способов диагностики женского бесплодия, а также изучить в эксперименте патогенез поствоспалительного бесплодия. Нами был предложен и внедрен в практику алгоритм обследования женщин, включающий ТВУЗИ, контрастную ГССГ, доплерометрию, фолликулогенез и расчет биофизического профиля матки (БПМ). Были выбраны 117 пациенток, обратившиеся в течение 2006 года, у которых был исключен мужской фактор бесплодия. Первичное бесплодие имело у 32,5% женщин, вторичное бесплодие 49,5% и 18% планирующих беременность. В анамнезе 75% обследованных пациенток перенесли воспалительные заболевания матки и придатков, у 10% гинекологические заболевания не были выявлены. Принципиально новые результаты мы получили по структуре маточной формы бесплодия, поскольку имеем возможность визуализировать и верифицировать эндометриоз тела матки. Согласно нашей статистике он встречается в 65% маточной патологии, что значительно превышает среднестатистические данные. У 26,5% пациенток был выявлен только низкий БПМ и наличие в анамнезе воспалительных гинекологических заболеваний и аборт. Экспериментальная часть работы выполнена на 144 крысах-самках линии Вистар. Воспаление внутренних половых органов вызывали введением под слизистую оболочку влагалища суточной культуры *Staphylococcus aureus* в дозе 3 млн микробных тел по стандарту мутности. 34% самок, перенесших воспаление гениталий, остались бесплодными. Способность к оплодотворению у них сохранялась. Гистологический анализ позволяет сделать заключение, что причиной бесплодия у животных этой группы является наличие хронического воспаления с выраженным аллергическим компонентом. Если на фоне перенесенного стафилококкового воспаления гениталий в стенке матки не наблюдается закономерной смены популяции гранулоцитов на агранулоциты, успешной имплантации бластоцисты не происходит. На основании полученных данных можно заключить, что наличие плотной эозинофильной инфильтрации в эндометрии совершенно несовместимо с развитием беременности, так как препятствует имплантации и формированию плаценты.

Отдаленные результаты хирургического лечения ишемической болезни сердца, осложненной сердечной недостаточностью

Левашов Н.А. Короткова М.П., Марченко А.В.

НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск

Лечение сердечной недостаточности (СН) является главной медицинской и социальной проблемой в мире. Распространенность СН варьирует от 0,4% до 2% и увеличивается до 5–10% у людей старше 65 лет [1]. При этом ишемическая болезнь сердца (ИБС) является наиболее частой причиной СН. Изолированная медикаментозная терапия у таких больных имеет неудовлетворительные результаты, в то же время, сниженная систолическая функция левого желудочка (ЛЖ) и симптоматическая сердечная недостаточность являются независимыми факторами риска операционной летальности [2]. Особый интерес для кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии представляют эффективность и преимущество хирургической стратегии. В связи с этим проблема широкого внедрения и совершенствования хирургических методов лечения ИБС видится крайне актуальной. Целью работы явилось установить наиболее эффективные методы хирургического лечения ИБС, осложненной СН.

Исследование проведено на основании анализа результатов обследования пациентов с ИБС и выраженной систолической дисфункцией ЛЖ, с фракцией выброса (ФВ) менее 35%, до и после хирургического лечения, через 6, 12 и 24 месяца. Установлено, что хирургическое лечение в отдаленном периоде приводит к регрессии СН и увеличению ФВ ЛЖ, уменьшению функционального класса стенокардии напряжения и увеличению толерантности к физическим нагрузкам. Обнаружено, что изолированная операция аортокоронарного шунтирования (АКШ) имеет положительные результаты в ближайшем послеоперационном периоде. Однако в отдаленном периоде наиболее оптимальные результаты достигнуты у пациентов после АКШ в сочетании с реконструкцией ЛЖ. Это позволяет считать данный метод наиболее эффективным способом хирургического лечения. Прецизионная оценка функции ЛЖ и резервов миокарда позволяет выбрать оптимальный вариант хирургического лечения. Необходимо учитывать клинико-анамнестические данные и оценивать значимые факторы риска госпитальной и отдаленной летальности.

1. The epidemiology of heart failure. European heart journal. 1997. Vol. 18(2). P. 208–225.
2. Contemporary performance of surgical ventricular restoration procedures: data from the Society of Thoracic Surgeons' National Cardiac Database. American heart journal. 2006. Vol. 152(3). P. 494-499.

Предложена новая модель низкодозной биконтрастной полипозиционной флюорографии желудка в скрининге рака желудка

Махотин А.А.¹, Бару С.Е.², Борисенко А.П.¹, Куликов В.Г.¹, Шевела А.И.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Институт ядерной физики им. Г.И.Будкера СО РАН, Новосибирск*

Профилактическая ранняя диагностика рака желудка (РЖ) — актуальная проблема гастроэнтерологии, онкологии, лучевой диагностики. Основным методом выявления РЖ является ЭГДС. Известные недостатки ЭГДС не позволяют считать этот метод скрининговым. Известен метод решения сложной задачи ранней диагностики РЖ, превосходящий ЭГДС по чувствительности — полипозиционная биконтрастная ФЛГ желудка (ПБФЛГЖ), при которой выполняется не менее 8 снимков в главных проекциях. Труднопреодолимым барьером на пути метода остается неизбежное превышение нормативов дозы, полученной человеком, при рентгенографических обследованиях. С целью снижения доз поглощенного излучения на порядок нами предложена новая схема и модель низкодозной ПБФЛГЖ в скрининге РЖ на аппарате с параллельным сканированием и автоматическим поворотным столом. Коллиматор вырезает из излучения трубки плоский веерообразный пучок рентгена, который после прохождения через обследуемого регистрируется детектором. Во время обследования трубка, коллиматор и детектор синхронно перемещаются относительно пациента. Данные с детектора о распределении излучения вдоль одной «строки» изображения каждые 2,5 мс записываются в память и формируют снимок, состоящий из 2000 «строк». Применена такая рентгенооптическая схема, когда регистрируется все прямое излучение, а рассеянное в его теле не регистрируется совсем. Применен специальный детектор, обладающий эффективностью, близкой к 100% и чрезвычайно низким значением собственных шумов ($\sim 3\text{г}$). Узкое щелевидное входное окно линейного детектора, действующее как эффективный отсеивающий растр, пропускает падающее на детектор прямое излучение и сводит регистрацию рассеянного в теле пациента излучения практически до нуля. В результате «вуаль», вызванная этой причиной, исчезает, что позволяет значительно уменьшить дозу облучения. В реализованной рентгеновской оптической схеме и высокоэффективном детекторе эта доза может быть снижена до теоретически целесообразного предела, определяемого статистической ошибкой в пикселе. **Выводы:** Предложенная схема ПБФЛГЖ прогнозирует низкие дозы, сопоставимые с широко распространенной ФЛГ органов грудной клетки, но в целях профилактического обследования желудка.

**Предварительное ХГЧ-тестирование, «ампулярная и фимбриальная точки»
в оптимизации ранней диагностики эктопической беременности**

Махотин А.А., Курганов С.А., Махотина Н.Е., Каленицкая Л.В., Макогон А.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

В ургентной гинекологической практике эктопическая беременность (ЭБ) занимает одну из лидирующих позиций. До 15% всех беременностей в силу клинической симптоматики угрожающего самопроизвольного выкидыша подпадают под подозрение в эктопической локализации. Недостаточная точность изолированного ТВУЗИ в определении ЭБ побуждает к активной инвазивной диагностической. Цель: повышение диагностической точности метода ТВУЗИ в визуализации эктопической беременности. УЗИ производились на сканере Voluson-730 Expert конвексными зондами трансвагинального сканирования ургентному контингенту больных с подозрением на прервавшуюся и/или прогрессирующую ЭБ. Проанализированы результаты УЗ поиска в двух группах больных. В первой группе больных качественный ХГЧ тест не был выполнен предварительно ТВУЗИ, во второй группе больных трансвагинальному УЗ поиску внематочно расположенного плодного яйца предшествовал ХГЧ-тест. Кроме того, поиск ЭБ при ТРУЗИ во второй группе больных осуществлялся по УЗ топографическим схемам локализаций т.н. «ампулярных и фимбриальных точек». Схемы локализаций ампулярного и фимбриального отделов маточных труб при ТВУЗИ были предложены и разработаны для оптимизации гистеросальпингосонографий. Ретроспективному анализу подвергнуты 1718 последовательных случаев клинических наблюдений больных с подозрением на эктопическую беременность за восьмилетний период (1999 – 2009 гг.). Комплекс методов эталонного контроля: интраоперационная верификация, гистологическое исследование использован для вычисления показателей информативности УЗ-методик. Показатели информативности в I группе: Ч составила 65%, С – 72%, ППЦ – 68%, ОПЦ – 59%, Т – 63%, во II группе: Ч – 98%, С – 99%, ППЦ – 99%, ОПЦ – 98%, Т – 99%. Полученные результаты позволили снизить количество необоснованных лапароскопий и сделать выводы: 1) при подозрении на ЭБ предварительное ХГЧ-тестирование выступает в роли высокочувствительного и высокоспецифичного диагностического «фильтра» и существенно повышает точность методики ТВУЗИ, облегчая дифференциальную диагностику синдрома гипогастральных болей в неотложной хирургической и гинекологической практике, 2) поиск ЭБ при ТВУЗИ по схемам локализации «ампулярной» и «фимбриальной точек» повышает диагностическую точность ТВУЗИ.

Предложены новая методика и новый критерий УЗД воспаления червеобразного отростка

Махотин А.А., Шевела А.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Повышение точности и скорости ранней неинвазивной диагностики острого аппендицита (ОА), его стадии и возможность визуализировать и различать нормальный червеобразный отросток (ЧО) и патологический – актуальные проблемы ургентной хирургической службы и лучевой диагностики. Цель: повышение точности УЗ метода диагностики ОА и формы его воспаления. УЗИ производились на сканере SSI-1000, SonoScape Company Limited, Китай, конвексными мультислотным датчиком 6V1 8-4 MHz/R11 интракавитального сканирования (ИКС) по новой авторской методике трансабдоминального сканирования (ТАС) при дозированной компрессии на переднюю брюшную стенку ургентному контингенту больных с клиникой острого живота. В исследование вовлечено 4587 пациентов за 9- летний период. По показаниям – при подозрении на тазовую локализацию ЧО, другую патологию органов малого таза ТАС дополнялось эндокавитальным сканированием (ЭКС). При прямой визуализации ЧО, для оценки его воспаления, применяли 10 описанных ранее и хорошо изученных диагностических критериев УЗД: увеличение диаметра ЧО ≥ 6 мм, наличие жидкости в просвете, ригидность, гиперемия стенки ЧО, изменения жировой клетчатки, лимфоаденопатия, перитонеальная жидкость, утолщение стенки слепой кишки > 5 мм, аппендиколитиаз, увеличение толщины стенки ЧО > 2 мм. Последний критерий, традиционно оспаривается из-за трудностей корректных измерений, т.к. слизистая любой интестинальной структуры характеризуется неровными контурами. Для изучения высказанной нами гипотезы об особой важности оценки толщины стромального компонента (ТСК) как для выявления воспаления ЧО, так и для прогноза стадии воспаления ЧО измеряли ТСК стенки ЧО. Сопоставлены данные УЗ, гистологических и морфометрических исследований. Предложенная методика визуализации ЧО позволяла обнаружить до 93% от всех патологически измененных и 35% нормальных ЧО. ТСК при неизменённом ЧО, катаральном, флегмонозном и гангренозном ОА составила $0,85 \pm 0,2$; $1,94 \pm 0,5$; $2,15 \pm 0,6$; $1,95 \pm 0,7$ мм, и коррелировала с данными гистологических и морфометрических исследований. Чувствительность предложенного критерия составила 91%, С – 95%, ППЦ – 92%, ОПЦ- 93%, Т – 94%. Увеличение ТСК ЧО, измеренной при поперечном УЗ сканировании до 1,5 мм и более, – высокочувствительный и, одновременно, высокоспецифичный критерий для ранней неинвазивной диагностики ОА в В-режиме.

Новые технологии комплексной диагностики причин женского бесплодия

Махотина Н.Е., Курганов С.А., Долгова Е.М., Махотин А.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Диагностический алгоритм выявления причин женского бесплодия должен начинаться с безопасных и универсальных методик. Цель: улучшить возможности УЗД в исследовании репродуктивной системы женщины на основе новых способов и алгоритма диагностики патологии полости матки, маточных труб, миометрия и яичников – контрастной гистеросальпингоскопии (КГССС). Использовался УЗ аппарат Voluson-730 Expert. Исследования выполнялись с 6-го по 12-й день менструального цикла. С целью оценки рисков поврежденности маточных труб перед КГССС определяли титр поздних антител к хламидиям. Для выполнения КГССС применялся способ исследования состояния полых органов (патент № 2290067). Для оптимизации методик оценки тока контрастных средств (КС) разработаны и применены топографо-анатомические обоснования визуализации ампулярного и фимбриального отделов маточных труб. Оценивались гидродинамические особенности потока контрастных средств в норме и при патологии. В режиме 3D оценивалась форма матки и топография патологических процессов матки. В ходе КГССС проводилась оценка объема, структуры, подвижности яичников, фолликулярного резерва. Проводился мониторинг фолликулогенеза и определялся биофизический профиль матки (БФПМ). Обследовано 735 пациенток с диагнозом бесплодие (1091 маточная труба): 818 (75,2%) маточных труб были проходимы, 109 (14,2%) – непроходимы в фимбриальных отделах и 164 (10,6%) – непроходимы в интрамуральных и истмических отделах. Чувствительность (Ч) предложенного способа и алгоритма в определении непроходимости маточных труб составила 94,7%, специфичность (С) – 88,6%, точность (Т) – 91,8%. В определении патологии полости матки Ч – 95,9, С – 92,1%, Т – 95,4%, соответственно. КГССС на основе последовательного применения эхонегативных и эхопозитивных КС позволяет надежно регистрировать критерии шеечного, маточного, трубно-перитонеального и яичникового факторов бесплодия. При проведении УЗ КГССС ампулярные и фимбриальные точки являются принципиально значимыми и важными проекционными ориентирами для применения методик определения тока КС, что повышает диагностическую точность в оценке проходимости маточных труб. Определение титра поздних антител к хламидиям, последующая оценка фолликулогенеза, БФПМ позволяют с высокой точностью определять причины женского бесплодия.

Эффективность использования аутологичных стволовых клеток и колониестимулирующих факторов при хронической артериальной ишемии нижних конечностей

Попов В.В.¹, Егоров В.А.¹, Морозов В.В.²

¹ *Городская клиническая больница № 12, Новосибирск*

² *ЦНМТ ИХБФМ СО РАН, Новосибирск*

В условиях тотального поражения артериального русла атеросклеротическим процессом только развитие сосудистых коллатералей может обеспечить как дополнительный приток артериальной крови в ишемизированные участки, так и улучшение путей оттока от сосудистого шунта. Именно стимуляцией ангиогенеза объясняются успешные результаты применения клеточных технологий в лечении хронической артериальной недостаточности атеросклеротического и диабетического генеза.

В настоящей работе излагаются результаты лечения больных облитерирующим склерозом сосудов нижних конечностей, оперированных по поводу реокклюзий после прямых реваскуляризирующих операций путем использования комбинированного введения стромально-сосудистой фракции липоаспирата с целью профилактики ближайших и отдаленных послеоперационных осложнений.

В результате проведенных исследований было доказано, что комбинированное введение стромально-сосудистой фракции липоаспирата после реконструктивных операций на артериях нижних конечностей при облитерирующем атеросклерозе положительно влияет на состояние артериального кровотока в отдаленном периоде за счет стабилизации его объемных и скоростных характеристик, способствует снижению степени хронической артериальной недостаточности в отдаленном послеоперационном периоде. По сравнению со стандартными протоколами ведения послеоперационного периода после повторных реваскуляризирующих операций при облитерирующем атеросклерозе сосудов нижних конечностей применение стромально-сосудистой фракции липоаспирата является предпочтительным за счет снижения частоты ранних тромбозов шунта и увеличения сроков его эффективного функционирования в отдаленном послеоперационном периоде. В работе также приводится обосновательная база для разработки и применения протоколов использования медикаментозных средств (колониестимулирующих факторов) для увеличения пула циркулирующих периферических стволовых гемопоэтических клеток в качестве альтернативного консервативного влияния на стимуляцию неоангиогенеза у данной категории больных.

Новые возможности фармакологической коррекции неврологических расстройств при синдроме позвоночной артерии

Морозов В.В.¹, Шушарин А.Г.¹

¹ *ЦНМТ ИХБФМ СО РАН, Новосибирск*

В современном мире значимую проблематику в неврологии представляют сосудистые поражения головного мозга и вертеброгенные заболевания нервной системы. Синдром позвоночной артерии (СПА) развивается на фоне остеохондроза шейного отдела позвоночника. СПА клинически проявляется симптомами нарушения кровообращения в экстракраниальном отделе и/или симпатического нервного сплетения позвоночной артерии — явлениями спазма мозговых артерий или преходящей ишемией в вертебробазилярной системе. Клинические проявления СПА чрезвычайно многообразны — головная боль, приступообразная, интенсивная, распирающая, пульсирующая, головокружения с тошнотой, иногда рвотой, вегетативными расстройствами. Имеют место зрительные нарушения (фотопсии, туман перед глазами), кохлеарные симптомы (шум, заложенность в ушах). Практически у всех страдающих СПА отмечаются субъективные проявления соматических, психоэмоциональных и надсегментарных вегетативных расстройств.

Предлагаемые способы лечения в основном базируются на принципах терапии остеохондроза в сочетании с симптоматическим лечением (мануальная терапия, физиолечение, специальная гимнастика, обезболивание, метаболическая терапия). Клиническая эффективность их оставляет желать лучшего. Настоящая работа была проведена с целью поиска и апробации простых и эффективных методов коррекции имеющихся патологических нарушений при СПА, имеющих патогенетическую ориентацию, сочетающих в себе простоту исполнения для врача и безопасность для пациента.

В результате проведенных исследований эффективности и безопасности применения субмастоидальных подкожных инъекций комплексной лекарственной смеси (дипроспан, лонгидаза, лидокаин, декстроза) у пациентов, страдающих СПА, на основании сравнительных данных, полученных при наблюдении динамики клинической картины, реоэнцефалографии, ультразвукового дуплексного сканирования сосудов головы и шеи, рентгенографии шейного отдела позвоночника и головы, были сделаны выводы о высокой клинической эффективности предлагаемого способа коррекции имеющихся нарушений неврологического статуса при СПА.

Современный взгляд на проблему безопасности антикоагулянтной терапии

Новикова Я.В.^{1,2}, Лифшиц Г.И.^{1,2}, Шевела А.И.^{1,2}, Воронина Е.Н.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Центр Новых Медицинских Технологий в Академгородке, Новосибирск*

Актуальность проблемы. Эффективность и безопасность антикоагулянтной терапии входит в число наиболее острых проблем современной практической медицины.

Цель исследования. Исследование направлено на изучение частоты встречаемости полиморфных вариантов генов CYP2C9 и VKORC1 у жителей Сибирского региона на примере г.Новосибирска, а также разработка клинических рекомендаций по терапии варфарином на основании полученных данных.

Материалы и методы. Использована периферическая кровь, полученная путем пункции локтевой вены и стабилизированная 2,5%-ным раствором ЭДТА в соотношении 10:1. Образцы геномной ДНК были получены фенол-хлороформной экстракцией, генетическое типирование проводилось методом ПЦР/ПДРФ анализа.

Результаты. На сегодняшний день получены результаты исследования полиморфных вариантов генов CYP2C9 и VKORC1 у 159 пациентов, которым была назначена антикоагулянтная терапия. Распределение различных полиморфных вариантов у этих пациентов было следующим.

Носителями CYP2C9*2 вариант С/С были 108 человек (68%), гетерозиготный мутантный вариант С/Т выявлен у 50 человек (31,4%), лишь 1 пациент был обладателем гомозиготного полиморфизма CYP2C9 Т/Т (0,6%). Подавляющее большинство пациентов группы исследования являются носителями полиморфизма CYP2C9*3 А/А – 157 человек (98,7%), а гетерозиготный вариант А/С выявлен у 2 человек (1,3%). Других полиморфизмов гена цитохрома 2C9 не обнаружено.

При исследовании гена VKORC1 была обнаружена любопытная тенденция – несмотря на то, что во всем мире подавляющее большинство людей являются носителями так называемого «дикого типа», т.е. варианта VKORC1 (С-1173Т) С/С, у обследованных пациентов преобладали носители гетерозиготного полиморфного варианта этого гена VKORC1 С/Т – 76 человек (47,8%). Вариант С/С выявлен у 61 пациента (38,4%), а гомозиготный вариант полиморфизма Т/Т обнаружен у 22 человек, что составляет 13,8%.

Заключение. Проводимое исследование уже на первых этапах показало важность полученных данных. Наличие среди пациентов, нуждающихся в проведении антикоагулянтной терапии, значительного процента «медленных» метаболизаторов должно повысить настороженность клиницистов при выборе дозы препарата.

Современные методы объективизации ноцицептивных восприятий

Патрушев А.Ю.¹, Морозов В.В.¹, Калмыкова О.И.²

¹. *ЦНМТ ИХБФМ СОРАН, г. Новосибирск*

². *Фонд «Медсанчасть 168», г. Новосибирск*

Современный уровень понимания процессов ноци- и антиноцицепции характеризует боль как системную интегративную функцию организма, реализующуюся через трансдукцию, трансмиссию, модуляцию и перцепцию. Составной частью трансдукции является накопление альгогенов, включая цитокины, в зоне повреждения тканей, трансмиссии — выделение нейротрансмиттеров, облегчающих проведение боли. Главную роль в процессе модуляции играет собственная антиноцицептивная система, включающая энкефалиновое, норадренергическое, серотонинергическое и ГАМК-ергическое звенья контроля проведения боли. Следовательно, и анальгетический компонент анестезии должен быть ориентирован на основные звенья формирования боли.

Изучение ноцицептивных и антиноцицептивных систем у человека в значительной степени ограничено отсутствием надежных информативных методов исследования. Первую систематизацию провел Гведел (1936 г.), основываясь на клинических признаках. Современный аппаратный мониторинг для оценки адекватности интраоперационного обезболивания предусматривает исследование ЭЭГ, анализ сердечного ритма, электромиографию, электропроводность кожи, а также учет вызванных соматосенсорных, слуховых и зрительных потенциалов. Биохимический мониторинг включает в себя оценку симпатического тонуса, уровня секреции катехоламинов и катаболических гормонов. Информативна динамика концентрации цитокинов (интерлейкины, ФНО) в крови.

На сегодняшний день не существует общепринятой методики точной оценки состояния ноцицептивной и антиноцицептивной систем организма. Перечисленные способы регистрации объективных характеристик, отражающих состояние этих систем, в большей степени доступны специализированным учреждениям, интересующимся фундаментальными изысканиями в области патофизиологии боли. Тем не менее проводимые исследования в области анестезиологии учитывают максимально доступное число цифровых значений, объективизирующих ноцицептивные восприятия интраоперационной боли. Наши материалы приносят определенный вклад в понимание объективной оценки боли в периоперационном периоде.

Обеспечение иммунологической безопасности гемотрансфузий

Пермякова В.И.

*Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск,
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

Современная концепция безопасности гемотрансфузий основана на обязательном фенотипировании эритроцитов доноров и больных, скрининге антиэритроцитарных антител. Это имеет очень важное клиническое значение для предупреждения гемолиза донорских эритроцитов, диагностики иммунологического конфликта при гетероспецифической беременности по антигенам системы Резус и других систем.

Для практического трансфузиолога это означает, что переливание эритроцитов можно осуществлять только в случае, если реципиент и донор идентичны по антигенам системы А, В, D, С, Е, с, е, Сw, Келл.

Переливание идентичных по антигенам эритроцитов позволит обеспечить право реципиента на качественную гемотрансфузионную терапию.

Эпилепсия у женщин с сочетанной гиперпролактинемией/гиперандрогенией

Предтеченская А.В., Некрасова М.Ф.

*Новосибирский государственный университет, Новосибирск
Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск*

Проанализирована связь эпилепсии с репродуктивными расстройствами и лабораторными показателями у женщин. Обследовано 45 женщин в возрасте от 22 до 35 лет, страдающих генерализованными формами идиопатической эпилепсии. Длительность заболевания 5–20 лет. Высокая частота репродуктивных расстройств (гипоменструальный синдром, бесплодие, спонтанные выкидыши), а также распространенность внешних эндокринозависимых признаков (вирильный гипертрихоз и угревая сыпь, превышение массы тела, галакторея, стрии, потеря волос) послужили поводом для детального гормонального обследования.

Лабораторное обследование включало изучение спектра гормонов: пролактин, ТТГ, ЛГ\ФСГ, кортизол, ДЭА-С, тестостерон, 17ОН-прогестерон и тиреоидные гормоны, — методом ИФА. За критерий оценки полученных показателей принята медиана (М). Всем больным выполнена МРТ головного мозга.

У 12 женщин — 26,6% — с поздним менархе (средний возраст — 17,4 года) — выявлены сочетанные варианты гиперсекреции пролактина и андрогенов (ДЭА-С, 17ОН-прогестерон, общего тестостерона). Из группы андрогенов наиболее стабильно повышался уровень ДЭА-С.

Ср. показатель пролактина — $2019,1 \pm 104,9$ mIU/L, составляет 7,9 М.

Ср. показатель ДЭА-С — $17,08 \pm 1,02$ mmol/L, составляет 3,7 М.

Эта комбинация гиперпролактинемии/гиперандрогении (ГП/ГА) у 10 женщин сочеталась с изменением структуры гипофиза при МРТ головного мозга, которые описывались как микроаденомы или неоднородность сигнала гипофизарной ткани.

Известно, что рецепторные механизмы влияния андрогенов в головном мозге весьма разнообразны [1]. Они определяют и стимулирование секреции гонадотропин-рилизинг-гормона (GnRH), и влияют на секрецию пролактина. Хронический избыток надпочечниковых андрогенов приводит к гиперсекреции пролактина и ЛГ.

1. Wolf O.T., Kirschbaum C. Function of dehydroepiandrosterone and its sulfate in central nervous system: effects of cognition and emotion in animals and humans// Brain res. Rev. 1999. V. 30.- P. 264—288
2. Akwa Y., Young J., Kabbadj K. Neurosteroids: biosynthesis, metabolism and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain // J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 1991. V. 40. P. 71—81

Полиморфизм гена CYP 2D6 системы цитохромов у больных шизофренией с двигательными нарушениями, на фоне приема нейролептиков.

Рудиков Е.В.¹, Филиппенко М.Л.², Иванова С.А.¹

¹ НИИ психического здоровья СО РАМН, Томск

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН Новосибирск

Тардивная дискинезия является серьезным осложнением нейролептической терапии при шизофрении и возникает у 20% больных в результате длительного приема нейролептиков и выражается в патологических неконтролируемых движениях. Это осложнение длительно персистирует после отмены препарата. При ее развитии наблюдается значительная внутрисемейная корреляция, что подтверждает крайнюю важность выявления предикторов ответа на нейролептики и побочных эффектов в лечении шизофрении для максимизации эффективности. Таким образом, перспектива индивидуализации терапии шизофрении основана на генетической информации.

В рамках исследования изучалось распространение аллельных вариантов гена системы цитохрома P450 CYP 2D6. Было обследовано 219 больных шизофренией и 65 психически и соматически здоровых добровольцев. Следует отметить, что исследованная выборка русских пациентов, больных шизофренией по частотам аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов системы цитохромов P450 — CYP 2D6*3 и CYP 2D6*4 соответствует таковым для европеоидных популяций. Выявлено, что аллель 2549del и генотип A/del полиморфного аллельного варианта гена CYP 2D6*3, ответственного за синтез дебрисохин-4-гидроксилазы, сопряжены с риском развития двигательных нарушений на фоне приема нейролептической терапии. (OR=6,19 и OR=4,39 соответственно, CI 95%). Результаты соотносятся с представлениями о том, что данные мононуклеотидные замены в гене CYP2D6 системы цитохромов приводят к синтезу ферментов со сниженной детоксикационной активностью, что в свою очередь может вызывать к замедлению биотрансформации нейролептиков и риск развития двигательных нарушений.

Продолжение исследований в этом направлении и выявление большего числа генетических маркеров, сопряженных с двигательными нарушениями может способствовать уменьшению риска развития побочных эффектов нейролептической терапии у психиатрических больных.

**Возможности магнитно-резонансной томографии
в оценке ликвородинамики и венозного оттока от головного мозга**

Савельева Л.А.¹, Ежова О.Б.^{1,2}, Тулупов А.А.^{1,2}

¹ *Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

Совершенствование диагностики и лечения цереброваскулярной патологии — одна из наиболее актуальных проблем современной медицины. Это связано прежде всего, с широкой распространённостью сосудистых заболеваний, а также нередким развитием на фоне поражения сосудов острых нарушений мозгового кровообращения, которые создают реальную опасность жизни больного либо тяжелой инвалидизации. При этом подавляющее большинство исследований посвящено изучению артериального звена мозговой гемодинамики и лишь в единичных работах обсуждается роль венозной системы в формировании цереброваскулярных заболеваний. Тем не менее, исследования последних лет, направленные на изучение различных отделов венозной системы и ликвородинамики, позволяют утверждать, что во многих случаях именно эти системы ответственны за развитие сложных и имеющих важнейшее физиологическое значение компенсаторных реакций, обеспечивающих постоянство мозгового кровотока и внутричерепного объема.

В данной работе предложена модификация методики Q-Flow на основе двухмерной фазоконтрастной МР-ангиографии, достоинства которой расширяют возможности морфофункционального исследования сосудистых и ликворосодержащих структур и позволяют количественно оценивать особенности потока крови и цереброспинальной жидкости. Получены данные о пиковой скорости потока, средние значения линейной и объемной скорости, а также площадей поперечного сечения верхнего сагиттального, поперечных, сигмовидных синусов головного мозга и внутренних яремных вен. Обнаружено, что в условиях нормы пиковая, линейная и объемная скорости кровотока по парным синусам головного мозга и внутренним яремным венам, а также площади поперечного сечения этих сосудистых структур достоверно отличаются слева и справа с преимущественной редукцией потока слева. Получены значения линейной, объемной и пиковой скоростей антеградного и ретроградного потока ликвора в переднем и заднем субарахноидальных пространствах шеи, а также произведена оценка площадей их поперечного сечения.

Исследования поддерживаются Советом по грантам Президента РФ в рамках государственной поддержки ведущих научных школ — «Магнитные явления в химии и медицине» (НШ-3604.2008.3).

**Клинические результаты использования протезов «БАСЭКС»
при реконструкции артериального русла нижних конечностей**

Савина Ю.С., Цыпляшук А.В., Кайдорин А.Г., Тетерин Г.В.

Городская клиническая больница № 11, Новосибирск

Актуальность поиска экзогенных пластических материалов, пригодных для реконструкции артерий большого круга кровообращения в настоящее время диктуется целым комплексом причин, главными из которых являются широкая распространенность патологии данной системы и ограниченность аутогенных материалов. Обладая абсолютной биологической совместимостью, наиболее часто употребляемый сегодня «золотой стандарт» — аутовена, далеко не всегда может быть применим ввиду некоторых недостатков, как то низкие прочностные свойства, склонность к дегенеративному ремоделингу, сопровождающийся снижением ее тромборезистентности, ограниченность материала в организме или его отсутствие, обратная конфузорность и наличие в вене клапанных створок, создающие нарушение ламинарности потока. Этим недостаткам лишены синтетические протезы, но при решении проблемы тромботических и инфекционных осложнений путем модификации покрытия экспланта остается открытым вопрос о биологической совместимости с тканями реципиента, а это, как известно, первое условие идеального протеза.

Целью данной работы явилась оценка результатов клинического применения протезов «БАСЭКС» при реконструкции артерии у пациентов с облитерирующим атеросклерозом. Основными критериями клинической эффективности протезов считаем срок первичной проходимости, свободу от протезно-обусловленных осложнений. Биологическая совместимость эксплантов с организмом реципиента оценивалась на основе сравнения общебиологических реакций пациентов с уже известной реактивностью на традиционные вмешательства.

В результате проделанной работы показана биологическая совместимость протезов «БАСЭКС» с организмом реципиента. Данные протезы демонстрируют в ходе клинического применения полную свободу от протезнообусловленных осложнений, а по показателям первичной проходимости не уступают «золотому стандарту»-аутовене. При бедренно-подколенно-тибиальных реконструкциях комбинация протеза «БАСЭКС» с аутовенозными вставками на уровне коленного сустава позволяет осуществлять прямые реваскуляризирующие вмешательства в условиях дефицита аутовенозной ткани. Кроме того, представляется интересным дальнейшее сравнение функции экзогенных пластических материалов в зависимости от их укладки в зоне коленного сустава.

Магнитно-резонансная томография в оценке венозного кровотока у пациентов с флеботромбозам

Шевела А.И.¹, Тулупов А.А.², Севостьянова К.С.¹

¹Центр Новых Медицинских Технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

²«Международный Томографический Центр» СО РАН, Новосибирск

В настоящее время основным диагностическим методом у пациентов с тромбозами глубоких вен является УЗИ. При всех своих достоинствах сонография затруднена в области малого таза, особенно у тучных пациентов. Наиболее перспективным в этом отношении является широкое внедрение в диагностическую практику магнитно-резонансной томографии (МРТ).

Цель: Оценить возможности магнитно-резонансной томографии в качественной и количественной оценке венозного кровотока у пациентов с посттромботической болезнью.

На МР-томографе Achieva фирмы Philips с напряженностью магнитного поля 1,5 Т было проведено исследование шести пациентам с посттромботической болезнью. Во всех случаях исследование начинали с рутинного протокола МР-томографии органов малого таза и проксимальных отделов нижних конечностей. Кроме того, проводили бесконтрастную трехмерную МР-ангиограмму, а для детального изучения количественных параметров венозного кровотока была использована методика количественной оценки потока Quantitative Flow (Q-Flow).

У пациентов с илиофemorальными тромбозами была выявлена степень окклюзии тромбированной вены, пути коллатерального венозного оттока — преимущественно подкожные вены (система нижних эпигастральных вен) и система внутренней подвздошной вены. Кроме того, во всех случаях отмечено компенсаторное расширение контрлатеральной вены. Также комплексное МРТ исследование органов малого таза позволило исключить экстравазальную компрессию (например опухолью) в этой области. Были измерены скоростные характеристики венозного кровотока сосудов малого таза на разных уровне границы перехода общей бедренной вены в наружную подвздошную.

Достоинства МРТ несомненно расширяют круг диагностических возможностей современной клиники и могут быть полезны у пациентов с венозными тромбозами и посттромботической болезнью, а полученные качественные и количественные данные о характере венозного кровотока могут не только дополнять и уточнять результаты сонографии у этих больных, но и проводить оценку труднодоступных для УЗИ венозных структур. Эта информация может быть полезна для коррекции консервативного лечения, решения вопроса об оперативном лечении основной патологии.

Распределения протромботических полиморфизмов генов у пациентов с флеботромбозами г. Новосибирска.

Шевела А.И., Егоров В.А., Севостьянова К.С., Новикова Я.В.

*Центр Новых Медицинских Технологий Института химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

За последнее десятилетие в группу наследственных тромбофилий включаются все новые полиморфизмы, но на настоящий момент далеко не для всех из них достоверно доказано влияние на риск развития венозных тромбозов. Кроме того, пока отсутствует определенная ясность, как с учетом генетической картины проводить профилактику венозных тромбозов, рецидивов и осложнений этого заболевания.

Цель исследования: определить распределение протромботических полиморфизмов у различных групп пациентов с тромбозами системы нижней полой вены.

Обследовано 100 пациентов с флеботромбозами нижних конечностей, разделенных на группы по возрасту и причине заболевания. Исследовались гены факторов плазменного и тромбоцитарного гемостаза и ферментов фолатного цикла.

Достоверно выявлена повышенная частота встречаемости мутации Лейдена V фактора свертывания у пациентов с идиопатическими тромбозами в сравнении со спровоцированными, что увеличивает риск развития флеботромбоза в 10 раз (O.R. — 10.455, p — 0,04, C.I. — [0.485–225.251]) для носителя мутантного аллеля в гомозиготном состоянии в сравнении с дикими гомозиготами. Сходная тенденция определена для XII коагуляционного фактора (O.R. — 4.722, p — 0,06, C.I. — [0.832–26.810]), и в меньшей степени для тканевого активатора плазминогена (O.R. — 4.920, p — 0.14, C.I. — [0.485–49.923]).

В группе «идиопатические венозные тромбозы» достоверно выше частота встречаемости гомозиготных полиморфизмов метилентетрагидрофолат дегидрогеназы 1958GG — 38,7%, в сравнении с группой «спровоцированные венозные тромбозы» — 18,5% (z — 1,957, p — 0,05, C.I. — [0,02197–0,382]), что незначительно влияет на риск развития венозного тромбоза, увеличивая его в два раза (O.R. — 2.438, p — 0.12, C.I. — [0.776–7.654]). Сходная тенденция найдена для гомозиготных полиморфизмов метилентетрагидрофолат-редуктазы 677TT (23,5%), метионин синтаза-редуктазы 66GG (21,8%) в сравнении с группой пациентов со спровоцированными венозными тромбозами — 13,6% и 15,1% соответственно.

Данные генотипирования помогут оптимизировать профилактику и лечение венозных тромбозов, но требуется дальнейшее исследование этого направления.

Антиоксидантный статус и микроэлементы крови у пациентов с лимфомой Ходжкина

Солдатова Г.С.^{1,2}, Захарчук Н.Ф.³, Новикова Т.В.⁴, Кускова Н.В.¹, Виноградов С.П.⁵

¹ НГУ, ² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, ³ Институт неорганической химии им. А.В.Николаева СО РАН, ⁴ ЦКБ СО РАН, ⁵ Институт вычислительной математики и математической геофизики СО РАН, Новосибирск

Доказано, что антиоксидантная система (АОС) и микроэлементы крови являются важнейшими составляющими гомеостаза человека. Если подходы к оценке АОС достаточно разработаны, то как в России, так и за рубежом к настоящему времени имеются лишь единичные исследования, посвященные изучению уровня некоторых микроэлементов и тиолов у онкогематологических больных.

Нами разработан простой и экспрессный инверсионно-вольтамперометрический способ исследования сульфгидрильных SH– и дисульфидных –SS– групп и их соотношении (ТДС), микроэлементов Se, Zn, Cd, Pb, Cu в крови и их взаимоотношений при различных стадиях развития онкогематологической патологии. Антиоксидантный статус оценивался по уровню малонового диальдегида, церулоплазмينا, глутатионредуктаза и витаминов альфа-токоферола и ретинола.

Обследовано 120 больных лимфомой Ходжкина (ЛХ), из них 29 пациентов до начала полихимиотерапии (ПХТ), 91 – в период стойкой клинико-гематологической ремиссии (КГР), в числе которых 32 – в рецидиве заболевания. Средний возраст – 36.5 ± 13.4 года.

Результаты. У больных ЛХ даже в период стойкой КГР сохраняются нарушения в антиоксидантном статусе, что требует определенной коррекции. При значительном истощении адаптационного резерва организма в дебюте заболевания и его рецидиве наблюдается снижение ТДС и увеличение –SS– групп ($p=0,03$), выраженный дефицит цинка в крови всех больных, дисбаланс между содержанием цинка и меди. Выявлен также дефицит свинца в крови больных ЛХ (0.30 ± 0.1 мкмоль/л) по сравнению со здоровыми ($0,5 \pm 0,15$ мкмоль/л). Показана достоверность различий в группах до ПХТ и рецидиве заболевания по уровню в крови цинка ($p=0,02$), меди ($p=0,03$), свинца ($p=0,04$).

Заключение. Полученные данные рекомендуется использовать в комплексных программах диагностики лимфом, могут свидетельствовать о тяжести заболевания, эффективности лечебных мероприятий и являться прогностическим признаком стойкости клинико-гематологической ремиссии онкогематологического заболевания. Метод инверсионной вольтамперометрии является безопасным, высокочувствительным, малозатратным в оценке гомеостаза человека.

Инновационные возможности высокопольной МРТ в клинической практике

Тулупов А.А.

*Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск
Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

В настоящее время в магнитно-резонансной томографии помимо классических методик получения изображения, использования разнообразных скоростных последовательностей, проведения исследований с контрастным усилением, существуют методики, позволяющие:

1. одномоментно исследовать шейный, грудной и пояснично-крестцовый отделы позвоночника, сосуды и паренхиматозные органы всего тела;
2. получать диффузионно-взвешенные изображения, проводить МР-трактографию и МР-перфузию, позволяющие оценивать водный обмен и капиллярную перфузию в поврежденных участках головного мозга, что открывает новые возможности в ранней диагностике и прогнозировании исхода ишемических изменений, а также в планировании оперативного лечения;
3. проводить функциональную МРТ, которая позволяет исследовать распознавательную, психическую, интеллектуальную и мыслительную функции головного мозга, лежащих в основе высшей нервной деятельности человека;
4. количественно оценивать поток крови и ликвора (методика Q-Flow), что дает возможность динамически оценивать движение крови и ликвора в кино-режиме и неинвазивно изучать объемную (мл/с), линейную (см/с), пиковую (см/с) скорости потока, а также многие другие количественные характеристики циркуляции крови и ликвора, что особенно важно при планировании оперативного лечения и в ранней диагностике ишемических изменений;
5. получать трехмерные изображения различных структур человеческого организма, в том числе – артериальных и венозных сосудов;
6. проводить спектроскопические исследования, которые позволяют неинвазивно изучать метаболические и биохимические процессы в поврежденных участках головного мозга, предстательной железы, печени и других органов;
7. проводить МРТ исследования детей младшего возраста и плода.

Такой широкий спектр научно-диагностических подходов к визуализации организма человека не может предложить ни один другой метод лучевой диагностики, предоставляя МР-томографии пальму первенства в этой области.

Исследования поддерживаются Советом по грантам Президента РФ в рамках государственной поддержки ведущих научных школ – «Магнитные явления в химии и медицине» (НШ-3604.2008.3).

Анализ кандидатных генов и функционального состояния системы гемостаза при тромбофилических состояниях

Цветовская Г.А.¹, Чикова Е.Д.², Воронина Е.Н., Новикова Я.В.²,
Лифшиц Г.И.¹, Данилкина С.Т.²

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Центр Новых Медицинских Технологий в Академгородке, Новосибирск*

Вопрос о полезности и необходимости генетического тестирования возникает не только у пациентов, но и специалистов практической медицины. По мнению В.П. Пузырева (2009), результаты геномных исследований для медицины следует оценить как важные, имеющие фундаментальное и практическое значение, но для успешного продвижения генетического тестирования (ГТ) необходима реконструкция взаимных ожиданий врачей, исследователей и пациентов.

Задачей данного исследования была попытка показать, насколько использование результатов генетического тестирования расширяет диагностические возможности в повседневной практической работе кардиолога, флеболога и врачей других специальностей. **С этой целью** проведено комплексное исследование венозной крови больных, включившее оценку функционального состояния системы гемостаза и генов предрасположенности к развитию различных форм тромбофилии.

Материал и методы исследования. Обследовано 64 пациента – жителей г. Новосибирска и НСО с различными формами тромбофилии в возрасте от 6 лет до 71 года. В исследование вошли 19 генов-кандидатов (25 аллельных вариантов), продукты которых участвуют в коагуляционном каскаде, системе фибринолиза, поддержании сосудистого тонуса и адекватного состояния эндотелия, метаболизме метионина (гены фолатного цикла).

В работе представлены данные о наличии синтропных генов — общих как для артериальных, так и для венозных тромбозов. Выявлен ряд интересных ассоциаций между клиническими характеристиками тромбофилии и полиморфными сайтами в некоторых генах эндотелиальных факторов, тромбоцитарных гликопротеидов, системы фибринолиза и ряда генов фолатного цикла. Показано, что эффективность диагностики и лечения во многом зависит от понимания врачом возможностей использования данных генетического тестирования для выяснения механизмов развития тромбофилии.

Отдаленные результаты радикальной простатэктомии

Чернышев В.В., Байбаков К.Ю., Отпущенников А.А., Петров В.Б.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск*

В структуре онкологических заболеваний у мужчин рак предстательной железы (РПЖ) продолжает занимать четвертое место, а по ежегодному приросту РПЖ стоит на первом месте среди всех онкологических заболеваний (24,1%). Заболеваемость РПЖ в Новосибирской области в 1988–1989 гг. составляла 15,9–16,0 на 100 тыс., а в 2005 году – 33,7 на 100 тыс. соответственно. Смертность от РПЖ в Новосибирской области в 1988–1989 гг. составила 10,5–6,9 на 100 тыс., а в 2005 году – 15,4–14,3 на 100 тыс. соответственно.

В нашем исследовании мы ретроспективно попытались оценить результаты позадилоной радикальной простатэктомии (РПЭ), выполненной по поводу клинически T1-T2 форм РПЖ.

Материалы и методы. В урологическом отделении ЦКБ СО РАН г. Новосибирска с 2000 по 2009 гг. выполнено 45 РПЭ при локализованном раке простаты. Проведен ретроспективный анализ 44 больных (97,7%), перенесших РПЭ. Средний возраст больных составил 58,5 года (от 45 до 71).

Средний уровень ПСА до операции составил 8,9 нг\мл (от 3,2 до 20,0 нг\мл). После операции стадия pT1 – T2 установлена у 32 (72,7%) больных, стадия pT3 – 10 (22,7%), стадия pT4 – 2 (4,6%). Метастазы в подвздошные лимфатические узлы выявлены у 4(8,8%) больных. Положительный хирургический край выявлен у 4(8,8%), ранение прямой кишки произошло в 2 случаях (4,4%). 8 (17,7%) больным проводилась адъювантная гормонотерапия. В течение 9 лет наблюдения выявлена частота биохимических рецидивов (рост ПСА выше 0,2 нг/мл, подтвержденный в 2 анализах) и клинически прогрессирование РПЖ. Из канцер-регистра раковых больных были получены данные о случаях смерти среди всех отобранных больных.

Результаты. В течение периода наблюдения выявлено 6 биохимических рецидивов (13,3%) и 5 случаев (11,1%) клинического прогрессирования. Средний срок наблюдения при анализе общей выживаемости составил 33,4 месяца. Пятилетняя выживаемость до биохимического рецидива составила 86,6%, до клинического рецидива – 88,8%. Всего умерло 4 больных (8,8%), причем от РПЖ и его осложнений 2(4,4%). Пятилетняя общая выживаемость – 91,1%, пятилетняя раковоспецифическая выживаемость – 95,5%.

Выводы. Радикальная позадилоная простатэктомия при локализованных формах РПЖ является золотым стандартом лечения и позволяет достичь приемлемых показателей пятилетней безрецидивной (ПСА) выживаемости.

Сравнительная оценка трансуретральной биполярной и монополярной электрорезекции гиперплазии простаты

Чернышев В.В., Байбаков К.Ю., Отпущеников А.А., Петров В.Б.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск*

Трансуретральная резекция (ТУР) сегодня остается «золотым стандартом» в хирургическом лечении доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ). Несмотря на длительный период освоения и применения метода, в среднем, по данным разных авторов, общее количество осложнений достигает 18%. Дальнейшее развитие эндоскопических вмешательств, направленное на преодоление недостатков, побочных эффектов и уменьшение количества интраоперационных осложнений, привело к созданию биполярной электрохирургии.

Материал и методы. Основным критерием выбора метода оперативного вмешательства является размер предстательной железы (ПЖ). При объеме ПЖ менее 60 мл больным выполнялась ТУР. В 2005–2006 гг. выполнено 17 монополярных ТУР. С июля 2007 г. в нашей клинике используется биполярный резектоскоп Karl Storz, выполнено 35 операций. Продолжительность операции составляла в среднем 45 мин при биполярной и 55 мин — при монополярной ТУР. Осложнение одно — гемотампонада мочевого пузыря при монополярной ТУР; при биполярной ТУР осложнений не было. Послеоперационный койко-день за 2005–2006 гг. составил 13,8, при биполярной ТУР — 11,0.

Выводы. Во время оперативного вмешательства диффузная кровоточивость тканей при биполярной ТУР меньше, чем при классической, улучшается видимость для хирурга в зоне операции. При биполярной ТУР возможно более раннее удаление уретрального катетера, что является одним из факторов профилактики инфекционно-воспалительных осложнений и сокращения послеоперационного пребывания больного в стационаре. Использование для ирригации во время операции солевого раствора целесообразно не только для предотвращения риска возникновения ТУР-синдрома, но и с экономической точки зрения.

Новый подход к лечению асептического некроза головки бедренной кости с применением перфторана

Шушарин А. Г., Куликов В. Г., Лифшиц Г. И., Шевела А. И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Асептический некроз головки бедренной кости (АНГБК), аваскулярный некроз (МКБ-10), заболевание полиэтиологического генеза, является следствием нарушения кровообращения, которое предшествует изменениям в структуре кости - омертвлению части костного вещества головки бедренной кости с последующим ее разрушением в наиболее нагруженном сегменте с исходом в коксартроз. То есть все некрозы головки бедренной кости, независимо от их первопричины, являются ишемическими.

Несмотря на внедрение новых высоких технологий в лечении АНГБК, полное восстановление сустава, как правило, не наступает. Наше внимание привлек препарат перфторан – плазмозамещающее средство на основе перфторорганических соединений, который обладает ярко выраженной способностью осуществлять эффективный газообмен в ишемизированных тканях и, удаляя накопившиеся токсические недоокисленные продукты, оказывает выраженный противовоспалительный и мембраностабилизирующий эффект [1].

В двух случаях у пациентов с АНГБК, сочетаемого с двухсторонним коксартрозом III степени, проведено лечение внутрисуставным введением перфторана прямой навигацией под УЗИ контролем с целью восстановления кровообращения в ишемизированной артерии круглой связки головки бедренной кости и восстановления кровообращения в субхондральной кости. Лечение проводилось 4 раза в неделю в течение 12 недель, контроль результатов осуществляли по МРТ. Внутрисуставное введение перфторана приводит к локализации и выведению продуктов некротизированной ткани, увеличению суставной щели, улучшению микроциркуляции и, как следствие, улучшению трофики сустава. Анализ и сопоставление контрольных снимков МРТ с исходными показывает, что результатом применения перфторана является значительная положительная динамика восстановления структуры и формы головки бедренной кости, а также уменьшение субхондральных кист.

1. Усенко Л. В., Царев А. В. Перфторан – современные реалии и перспективы. Ж. Общая реаниматология. 2007. Т. III. № 3. С. 5–7.

Опыт восстановления связочно-мышечного волокна инъекциями лонгидазы

Шушарин А.Г., Лифшиц Г.И., Шевела А.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Фиброз, фибросклероз – патологическое развитие соединительной ткани, которое может возникнуть, как следствие неправильно проведенного лечения глюкокортикостероидными (ГК) препаратами при суставных болезнях. В ряде исследований было показано, что ГК не только не всегда оказывают положительный эффект, но в некоторых случаях их введение может приводить к потере протеогликана хряща [1].

Пациентке Н.С., с диагнозом посттравматический артрит, в поликлинике поставили в течение двух недель 6 инъекций кеналога. Через полмесяца больная обратилась в ЦНМТ с болями в суставе, в области лучезапястного сустава наблюдалось синюшное окрашивание кожных покровов, деформация и локальные трофические изменения тканей. При УЗИ обследовании был поставлен диагноз – посттравматический артрит, совмещенный с синовиом, возможно вторичного происхождения, индуцированным ГК инъекциями. Пациентке нами был проведен курс глубоких инъекций ферментного препарата лонгидазы с гиалуронидазной активностью 3000 МЕ («НПО Петровакс Фарм», Россия) локально в место повреждения связочного волокна; 10 инъекций лонгидазы через день. Боли в суставе прекратились после двух первых инъекций, по окончании курса уколов наблюдалось полное восстановление атрофированного мышечного волокна, выравнивание поверхности относительно неповрежденных тканей и нормализация окраски кожных покровов.

Удачный результат получен нами также при применении лонгидазы в терапии посттравматического артроза коленного сустава с осложнениями в виде ГК-индуцированного синовита. Эти клинические случаи демонстрируют эффективность применения глубоких инъекций лонгидазы в противовоспалительной терапии ГК-индуцированного синовита и вызванного инъекциями кеналога фибросклероза. Инъекции лонгидазы стимулируют морфологические изменения и восстановление поврежденной хрящевой ткани, что в достаточно короткие сроки приводит к восстановлению связочно-мышечного волокна и полного объема движения в суставе.

1. Kaiser H., Kley H. Cortisontherapie: Corticoide in Klinik und Praxis. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1997, 459 p.

Новые аспекты лечения АПЖ

Яковец Е.А.¹, Карпенко А.А.², Неймарк А.И.³.

¹ *Центр Новых Медицинских Технологий в Академгородке Новосибирск*

² *НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск*

³ *Алтайский государственный медицинский университет, кафедра урологии, Барнаул*

Аденома предстательной железы (АПЖ) – частое заболевание мужчин старше 50 лет. В результате многочисленных исследований удалось установить ряд фактов, которые позволили пересмотреть отношение к этому заболеванию и выработать новую тактику лечения. Существует категория пациентов, которым оперативное лечение не показано из-за высокого риска на фоне тяжелой сопутствующей патологии, а консервативная терапия не дает положительного эффекта. Учитывая недостатки существующих методов лечения, нами предложен новый метод лечения АПЖ – рентгенэндоваскулярная чрезкатетерная эмболизация артерий, питающих предстательную железу (РЭВЧКЭ). Целью нашего исследования явилось улучшение результатов лечения больных АПЖ, путем уменьшения размеров узла предстательной железы. Доступ к артериям осуществляется посредством пункции бедренных артерий по Сельдингеру. Следующим этапом под флюороскопическим контролем в артерии медленно вводятся частички поливинилалкоголя или микросферы. В результате эмболизации артерий простаты происходит инфаркт аденоматозных узлов, при этом ткань аденомы страдает в значительно меньшей степени. На микроскопическом уровне аденоматозные узлы подвергаются склерозированию, четко отграничиваясь от окружающей ткани простаты. Нами пролечено 40 больных с АПЖ, из них имели сопутствующую патологию 30 человек. Показания к операции: неэффективность медикаментозного лечения, невозможность проведения хирургического лечения у больных с тяжелой сопутствующей патологией. Противопоказания: непереносимость контрастных веществ, инфаркт миокарда сроком до 3 месяцев, тяжелые коагулопатии. При поступлении у всех пациентов был объем остаточной мочи до 500 мл, ноктурия до 6 раз. По шкале IPSS было от 23 баллов. ТРУЗИ простаты: объем предстательной железы — 96,2 см³, объем узла — 60,36 см³. Всем им была проведена РЭВЧКЭ. Результаты: количество остаточной мочи уменьшилось до 150 мл, ноктурия до 1 раза за ночь, симптомы по шкале IPSS уменьшились до 7 баллов. ТРУЗИ – объем предстательной железы уменьшился до 42,01 см³, объем узла — 17,04 см³. Таким образом, РЭВЧКЭ – альтернатива хирургическим методам лечения при неэффективности консервативной терапии.

Комплексное применение современных хирургических методик в лечении варикозной болезни

Шевела А.И.^{1,2}, Егоров В.А.^{1,2}, Новикова Я.В.^{1,2}, Севостьянова К.С.^{1,2},
Якубонис В. А.^{1,3}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Центр Новых Медицинских Технологий в Академгородке, Новосибирск*

³ *Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск*

Актуальность: варикозная болезнь нижних конечностей является одним из самых распространенных в мире заболеваний.

Материалы и методы. За 2008 год нами было прооперировано 124 пациента (44 мужчины и 80 женщин, средний возраст 44 лет) с варикозной болезнью нижних конечностей, из них 75 пациентов операция выполнена на двух нижних конечностях. По стадии хронической венозной недостаточности пациенты распределились следующим образом: 6 человек (4,8%) стадии С5-6 (СЕАР), 9 человек (7,2%) стадии С4 (СЕАР), остальные пациенты имели классы С2-3. На этапе кроссэктомии для диссекции мягких тканей и лигирования проксимальных притоков БПВ диаметром до 6 мм использовали гармонический ультразвуковой скальпель. При измененной БПВ и наличие рефлюкса на уровне остиального клапана – применяли технику короткого стриппинга инвагиационным методом. Для удаления варикозных притоков на бедре и голени выполняли минивенэктомию по Мюллеру. Во время всей операции нижние конечности находились в возвышенном положении, на оперируемой конечности добивались редукции кровотока путем наложения пневматической манжеты. У пациентов с высокими стадиями варикозной болезни, при наличии трофических расстройств различной степени выраженности мягких тканей в области несостоятельных перфорантов, применяли метод субфасциальной эндоскопической диссекции – SEPS. У пациентов с выявленными тромбофилиями, а также при наличии в анамнезе перенесенного венозного тромбоза, выполняли периоперационную профилактику НМГ в дозах, соответствующих клинической ситуации.

Результаты. У 121 пациента (97,5%), перенесших вмешательство по вышеприведенной методике, осложнений отмечено не было. В двух случаях (1,6%), на этапе освоения методики, в первые сутки после операции было зарегистрировано образование подкожной гематомы и в одном случае (0,8%) – послеоперационной лимфорее, что потребовало ревизии и дренирования раны в течение 1 суток.

Выводы. Применение приведенных принципов оперативного лечения варикозной болезни позволяет значительно оптимизировать процесс хирургического вмешательства и послеоперационной реабилитации пациентов с варикозной болезнью любой стадии.

Авторский указатель

Авторский указатель

- Aperia A. 121, 122, 123
Beate Roder 111
Belousova E. A. 58
Bichenkova E. V. 56
Bondar A. A. 121, 122, 123
Borisevich V. 30
Brismar H. 122, 123
Bryce R. A. 56
Сильников В. Н. 65
Ghattas M. 56
Gunnarson E. 123
Hudman D. 30
Illarionova N. B. 123
Kamali-Zare P. 122
Kaoru Sugawara 47
Kruft Volker 40, 41
Lavrik O. I. 58
Lebedeva N. A. 58
Li Y. 122, 123
Maga G. 58
Shakhmatov M. 30
Spicarova Z. 121
Tabernero L. 56,
Tsuladze G. 30,
Xiao Li Lu 121
Zelenin S. M. 122, 123
Zelenina M. N. 122
Абрамова Т. В. 97
Агеева Т. А. 71
Адамович С. Н. 81
Александрова И. Б. 143
Алексеева И. В. 119
Алехина Т. А. 89
Ангельский А. А. 144
Анищенко В. В. 134
Антонец Д. В. 63, 78
Антонова Т. Л. 134
Ардашов О. В. 79, 139
Артемьева Л. В. 92
Афиногенова Г. Н. 35
Бабайлов С. П. 83
Бабкина И. Н. 137
Бабко А. Н. 145
Бабушкина И. В. 90
Бабушкина Н. П. 20, 146, 147
Бадуев Б. К. 90
Баев Д. С. 75
Бажан С. И. 63
Байбаков К. Ю. 179, 180
Байков И. К. 98
Банникова Л. М. 62
Баранова С. В. 66, 120
Бару С. Е. 161
Барякин Д. Н. 99
Батурина О. А. 28
Бахвалова В. Н. 62
Безуглова А. М. 108
Беланов Е. Ф. 110
Билтуева Ю. Н. 21
Богородская С. Л. 90
Бондарь А. А. 104
Борисенко А. П. 161
Бормотов Н. И. 110
Боровский Г. Б. 90
Боярских У. А. 21, 23
Брагина Е. Ю. 20
Бреннер Е. В. 28
Брызгалов А. О. 80
Брызгунова О. Е. 34, 104
Будилкин Б. И. 113
Бунева В. Н. 64, 66, 93, 133
Буравлева Е. Ю. 148
Бычкова О. Ю. 147
Вайнер А. С. 23

- Васильева С. В. 113
Веденин А. Н. 42
Велиев А. С. 35
Велиев С. Н. 35
Веньямина А. Г. 69, 105, 108, 115
Виноградов С. П. 82, 176
Вихрова М. А. 100
Владимирова А. В. 115
Власов В. В. 34, 65, 69, 70, 104, 114, 115
Войников В. К. 90
Волчо К. П. 79, 139,
Воробьев Ю. Н. 57
Воробьева М. А. 115
Воронина Е. Н. 23, 105, 150, 156, 157, 167, 178
Габибов А. Г. 132
Гаврилова Е. В. 112
Ганюкова Н. Г. 149
Герасимова Ю. В. 107
Гилева И. П. 78
Глупов В. В. 62
Голубев С. С. 90
Гончаренко А. К. 61
Гончарова Е. П. 65
Грачева М. А. 24
Грин И. Р. 49
Гришин Ю. А. 127
Гусев В. А. 62
Гуськова Е. В. 150
Гущина Т. А. 136
Данилкина С. Т. 150, 178
Демина А. В. 109
Демина О. К. 61
Дзюба С. А. 127, 131
Димитриади Ю. Н. 21
Дмитриенко Е. В. 31
Добродеев А. Ю. 34
Долгова Е. М. 151, 152, 164
Дубровская В. В. 110, 132
Дурьманов А. Г. 126
Дыдикова О. А. 153
Дымова М. А. 19
Егоров В. А. 165, 175, 184
Ежова О. Б. 172
Елистратова Е. В. 34, 114
Еркович А. А. 155
Ермоленко Н. А. 22
Жарков Д. О. 48, 49, 50, 52, 106
Жираковская Е. В. 27, 101, 109
Завьялов А. А. 34
Задесенец К. С. 104
Замошникова А. Е. 91
Запороженко И. А. 31
Зарубина Н. А. 21, 22, 23
Захарова О. Д. 120
Захарчук Н. Ф. 176
Зенкова М. А. 65, 69, 70, 71, 76, 115
Зырянова А. В. 35
Иванов А. В. 124
Иванов М. К. 125
Иванова Л. Н. 89
Иванова С. А. 107, 171
Игнашкина М. Б. 126
Ильин А. А. 128
Ильина Е. С. 53, 54,
Ильина И. В. 79, 139
Ильичева Т. Н. 126
Ищенко А. А. 51
Казачинская Е. И. 30
Кайдорин А. Г. 173
Каледин В. И. 76
Каленицкая Л. В. 162
Калмыкова О. И. 168
Камынина Т. П. 99
Канажевская Л. Ю. 50
Карпенко А. А. 183
Карпова Г. Г. 124, 128, 130
Киншт В. Н. 19
Клименко Е. С. 138

- Клименков И. В. 138
Кнорре Д. Г. 127
Князева А. Г. 85
Коваль В. В. 50, 51, 119, 127, 131
Коваль О. А. 99, 129, 137
Ковпак М. П. 65
Кожин П. М. 154
Козлова Ю. Н. 134
Козловский Л. И. 62
Колесникова О. П. 81
Колосова Н. Г. 39
Колпаков М. А. 154
Коневец Д. А. 113
Константинов Ю. М. 138
Копылова Л. В. 39
Кормилкин А. И. 155
Короткова М. П. 160
Косинова О. А. 130
Косолобов С. С. 31
Костина Е. В. 32
Кох Н. В. 156
Красикова Ю. С. 55
Кроль А. 130
Круглова Н. С. 69
Круфт Ф. 40, 41
Кудаева О. Т. 81
Кудрявцева Е. А. 157
Кузнецов Н. А. 127, 131
Кузнецова А. А. 102
Кулак М. В. 126
Кулемзин С. В. 91
Кулигина Е. В. 99, 129, 137
Куликов В. Г. 145, 152, 158, 161, 181
Куляшова К. С. 84
Курганов С. А. 159, 162, 164
Курильская Т. Е. 90
Курская О. Г. 126
Кускова Н. В. 82, 176
Кутузов М. М. 53
Кучер А. Н. 20, 146, 147
Лаврик О. И. 53, 54, 55
Лазарев А. Ф. 21, 22
Лактионов П. П. 34, 104, 114
Латышев А. В. 31
Лбров Г. С. 62
Леванов Л. Н. 98
Левашов Н. А. 160
Левковская Г. Г. 81
Легостаева Е. В. 84
Липко С. В. 138
Лисачев П. Д. 140
Литвяков Н. В. 34
Лифшиц Г. И. 102, 148, 150, 157, 167, 178, 181, 182
Логашенко Е. Б. 76
Локтев В. Б. 30
Ломзов А. А. 105
Лосева Е. М. 104
Лутова С. Л. 62
Мазуркова Н. А. 61
Майбородин И. В. 92
Макогон А. В. 162
Максакова Г. А. 32
Максютов А. З. 63
Максютов Р. А. 112
Малахина Е. С. 148
Мальгин А. А. 124, 128, 130
Мальцева Е. А. 55
Маркель А. Л. 89
Марков А. В. 76
Марченко А. В. 160
Матвеев А. Л. 92, 103
Матвеев Л. Э. 98, 137
Матвеева В. А. 92, 129, 137
Махотин А. А. 152, 155, 158, 161, 162, 163, 164
Махотина Н. Е. 162, 164
Мечетин Г. В. 52
Мечетина Л. В. 91

- Мещанинова М. И. 69
Мещерякова И. А. 39
Милов А. Д. 127, 131
Миронова Н. Л. 70
Мирскова А. Н. 81
Михеев В. Н. 62
Мордвинцева А. В. 83
Морозкин Е. С. 104
Морозов В. В. 165, 166, 168
Морозов И. В. 28, 29
Морозов С. В. 39
Морозова В. В. 103, 132
Морозова Е. А. 77
Морозова О. В. 62
Морозова С. А. 36
Москалева Н. Е. 42
Мошкин М. П. 145
Назаренко М. С. 147
Назаренко Н. Н. 85
Назаркина Ж. К. 53, 54
Наякшин А. М. 91
Невинский Г. А. 64, 66, 93, 106, 108, 120, 133, 135, 136
Неймарк А. И. 183
Некрасова М. Ф. 170
Непомнящих Т. С. 78
Нетесов С. В. 27, 109
Никифоров С. Б. 138
Николин В. П. 76
Новикова М. А. 138
Новикова Т. В. 176
Новикова Я. В. 102, 167, 175, 178, 184
Новопашина Д. С. 105
Одинцова Е. С. 66, 93
Отпущенников А. А. 179, 180
Павлова А. В. 79, 139
Панасюк Г. В. 125
Парахневич Н. М. 124
Пархоменко Т. А. 66, 133
Пасман Н. М. 156
Патрушев А. Ю. 168
Патутина О. А. 70, 71
Перебоев А. В. 30
Пермякова В. И. 104, 169
Петров В. Б. 179, 180
Петрова В. Д. 21, 22
Петровский Д. В. 145
Петрусева И. О. 55
Пивоваров Ю. И. 90
Полякова Г. Л. 62
Попкова Т. П. 138
Попов А. В. 57
Попов В. В. 159, 165
Попова Н. А. 70, 76
Поспелова Т. И. 82
Посух О. Л. 33
Предтеченская А. В. 170
Привалова А. С. 115
Пустыльняк В. О. 140
Пыльник Т. О. 89
Пышная И. А. 31
Пышный Д. В. 31
Разумов И. А. 30
Ребриков Д. В. 36
Редина О. Е. 89
Репин В. Е. 134
Речкунова Н. И. 55
Рихтер В. А. 99, 129, 137
Ровных Ю. А. 35
Романенко Е. П. 84
Романовская А. А. 126
Рубцов Н. Б. 104
Рудиков Е. В. 171
Рудко А. А. 20
Рудницкая Т. А. 154
Румянцева Н. В. 154
Румянцева Ю. В. 39
Рыкова Е. Ю. 34, 114

- Рябинин В. А. 32
Рябчикова Е. И. 61, 70
Рязанова М. А. 89
Савельева Л. А. 172
Савельева Т. Е. 92
Савина Ю. С. 173
Савицкая Е. Б. 35
Салахутдинов Н. Ф. 76
Саломатина О. В. 76
Самойлова Р. И. 127, 131
Сапарбаев М. 51
Саранина И. В. 134
Саттарова Е. А. 106
Святченко В. А. 30
Севостьянова К. С. 174, 175, 184
Седых С. Е. 135
Селезнева И. А. 21, 22
Семенов Д. В. 99, 129, 137
Семенов С. А. 134
Сенькова А. В. 71
Сидоренко С. П. 91
Сидоренко В. С. 52
Сизякина Л. П. 66
Сильников В. Н. 97, 113
Синицина О. И. 106
Синкина Т. В. 21, 22
Синяков А. Н. 32
Сказов Р. С. 43
Скворцова Т. Э. 34
Смирнова Л. П. 107
Смоленская С. Э. 89
Снытникова О. А. 39
Соболева С. Е. 136
Соколова О. О. 140
Солдатова Г. С. 35, 82, 149, 176
Сорокина И. В. 75
Спицына Ю. Е. 61
Стариков А. В. 34
Судаков Н. П. 138
Суханова М. В. 53
Сушко А. Г. 22
Тамкович С. Н. 34
Таранин А. В. 91
Таранов О. С. 61
Терехова С. А. 21, 22
Терлеева О. П. 84
Тетерин Г. В. 173
Тиванова А. С. 108
Тикунов А. Ю. 27, 101, 109
Тикунова Н. В. 27, 98, 100, 101, 103, 109, 110, 132, 137
Тимофеева Н. А. 51
Титов С. Е. 125
Тихонов А. Я. 102
Ткачева Н. А. 102
Толстикова Т. Г. 75, 77, 79, 80, 139
Тоневицкий А. Г. 36
Трегубчак Т. В. 78
Трофимов Д. Ю. 36
Тузииков С. А. 114
Тузииков Ф. В. 120
Тулупов А. А. 172, 174, 177
Тупикин А. Е. 29
Уваркин П. В. 84
Федорова О. С. 50, 51, 102, 107, 111, 119, 127, 131
Федосеева Л. А. 89
Филипенко М. Л. 19, 21, 22, 23, 105, 148, 150, 156, 157, 171
Филиппов Н. С. 31
Фокина А. А. 108
Фомин А. С. 129, 137
Хальзов А. В. 134
Хвостов М. В. 80
Хлусевич Я. А. 110
Хлусова М. Ю. 84
Ходырева С. Н. 53, 54
Холодарь С. А. 105
Храпов Е. А. 148

- | | |
|---|-----------------------------|
| Цветков Ю. Д. 127 | Шевченко С. П. 148, 152 |
| Цветовская Г. А. 178 | Шелестюк П. И. 34, 114 |
| Цветовская Г. А. 34 | Шестопалов А. М. 126 |
| Центалович Ю. П. 39 | Шихалева Н. Ф. 82 |
| Цыплящук А. В. 173 | Шишигина Н. С. 107 |
| Челобанов Б. П. 35 | Шмакова Е. А. 134 |
| Чепа М. В. 147 | Шнайдер Е. П. 145 |
| Чердынцева Н. В. 34 | Штарк М. Б. 140 |
| Черноловская Е. Л. 69 | Шульгина Н. И. 62 |
| Черноносков А. А. 111 | Шульц Э. Э. 77 |
| Чернышев В. В. 179, 180 | Шушарин А. Г. 166, 181, 182 |
| Черняк Е. И. 39 | Щелкунов С. Н. 78, 112 |
| Чешенко И. О. 35 | Щербаков Д. Н. 112 |
| Чикова Е. Д. 34, 178 | Юн Т. Э. 92 |
| Шакиель Г. 34 | Юрченко М. Ю. 91 |
| Шаркеев Ю. П. 84 | Яковец Е. А. 183 |
| Шевела А. И. 145, 151, 152, 155, 158, 161, 163,
167, 174, 175, 181, 182, 184 | Якубонис В. А. 184 |
| Шевкопляс Е. В. 36 | Ямщиков В. А. 30 |
| | Яньшина Д. Д. 128 |

Участники конференции

Bichenkova Elena Vladimirovna	The University of Manchester, Manchester, UK Elena.V.Bichenkova@manchester.ac.uk
Kruft Volker	Applied Biosystems part of Life Technologies Darmstadt, Germany Volker.Kruft@lifetech.com
Sugasawa Kaoru	Biosignal Research Center Organization of Advanced Science and Technology Kobe University, Kobe, Japan ksugasawa@garnet.kobe-u.ac.jp
Абрамова Татьяна Вениаминовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск abramova@niboch.nsc.ru
Александрова Ирина Борисовна	Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск viganyukov@mail.ru
Алексеева Ирина Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск Irina.Alekseeva@niboch.nsc.ru
Ангельский Александр Альбертович	Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск a-an2000@mail.ru
Антонец Денис Викторович	Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзор, Новосибирск antonec@yandex.ru
Артемяева Людмила Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск vam@niboch.nsc.ru
Бабайлов Сергей Павлович	Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СОРАН, Новосибирск babajlov@che.nsk.su
Бабко Андрей Николаевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск office@cnmt.ru

Бабушкина Надежда Петровна	НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск nad.babushkina@medgenetics.ru
Баев Дмитрий Сергеевич	Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск mitja2001@gmail.com
Байков Иван Константинович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск ivan_baykov@mail.ru
Баранова Светлана Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СОРАН, Новосибирск swb@ngs.ru
Барякин Дмитрий Николаевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск dmitri_baryakin@ngs.ru
Белюсова Екатерина Анатольевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск rina@niboch.nsc.ru
Бондарь Александр Анатольевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск alex.bondar@mail.ru
Боровский Геннадий Борисович borovskii@sifibr.irk.ru	Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
Боярских Ульяна Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск boyarskih.u@gmail.com
Бреннер Евгений Владиславович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск brenner@niboch.nsc.ru
Бунева Валентина Николаевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск buneva@niboch.nsc.ru

Бурявлева Ева Юрьевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск evabur@mail.ru
Вайнер Александра Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск hamlet85@mail.ru
Васильева Инна Анатольевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск iva@niboch.nsc.ru
Васильева Светлана Викторовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск vasilieva_2001@mail.ru
Веняминава Алия Гусейновна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск ven@niboch.nsc.ru
Вихрова Марина Алексеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск vikhrova_m@mail.ru
Власов Валентин Викторович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск vvv@niboch.nsc.ru
Воробьев Юрий Николаевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск ynvorob@niboch.nsc.ru
Ганиюкова Надежда Григорьевна	Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск viganyukov@mail.ru
Грачева Мария	ЗАО «Рош-Москва», Москва maria.gracheva@roche.com
Грин Инга Ростиславовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск existence@gorodok.net

Гусев Виктор Александрович	Институт математики им. С.Л. Соболева СО РАН, Новосибирск vgus@math.nsc.ru
Гуськова Екатерина Владимировна	Новосибирский государственный университет, Новосибирск gusy@ngs.ru
Дмитриенко Елена Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск Elena.Dmitrienko@niboch.nsc.ru
Долгова Елена Михайловна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г.Новосибирск d555777@ngs.ru
Дыдикова Ольга Александровна	Центр Новых Медицинских Технологий ИХБФМ Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск odydikova@mail.ru
Елистратова Елена Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск alenakol@mail.ru
Ермоленко Наталья Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск kostrykina@gmail.com
Жарков Дмитрий Олегович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск dzharkov@niboch.nsc.ru
Жираковская Елена Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск ezhr@niboch.nsc.ru
Зенкова Марина Аркадьевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск marzen@niboch.nsc.ru
Иванов Антон Валерьевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск antoniv@niboch.nsc.ru

Иванов Михаил Константинович	Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск imk@ngs.ru
Игнашкина Мария Борисовна	Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзор, Новосибирск» Роспотребнадзора, Новосибирск ignashkina84@rambler.ru
Ильин Алексей Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск ymanster@mail.ru
Ильина Екатерина Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск katya.plekhanova@gmail.com
Канажевская Любовь Юрьевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск amyp@niboch.nsc.ru
Карпова Галина Георгиевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск karpova@niboch.nsc.ru
Князева Анна Георгиевна	Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск anna@ispms.tsc.ru
Коваль Владимир Васильевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск koval@niboch.nsc.ru
Коваль Ольга Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск o.koval@niboch.nsc.ru
Ковпак Михаил Петрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск kmp1985@rambler.ru
Колесникова Ольга Петровна	НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск iscreen2001@ail.ru

Колпаков Михаил Аркадьевич	Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск kolpakov@gorodok.net
Константинов Юрий Михайлович	Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск yukon48i@mail.ru
Копылова Людмила Владимировна	Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск lucy@tomo.nsc.ru
Кормилкин Александр Иванович	Республика Хакасия, Республиканская больница им. Г.Я. Ремишевской, Абакан khak.uro@mail.ru
Косинова Ольга Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск olga.kossinova@gmail.com
Кох Наталья Викторовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск natashakoch@mail.ru
Круглова Наталья Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск natalia.kruglova@niboch.nsc.ru
Крячко Екатерина Викторовна	Applied Biosystems part of Life Technologies Москва, Московское представительство Ekaterina.Kryachko@lifetech.com
Кудрявцева Екатерина Алексеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск kudryavtseva_kathrin@ngs.ru
Кузнецов Никита Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск Nikita.Kuznetsov@niboch.nsc.ru
Кузнецова Александра Александровна,	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск sandra-k@niboch.nsc.ru

Кулемзин Сергей Викторович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск qzak@bionet.nsc.ru
Куликов Виталий Геннадьевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск kulikov_vitalii@mail.ru
Курганов Сергей Афанасьевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск superdoctor@ngs.ru
Кускова Наталья Витальевна	Новосибирский государственный университет, Новосибирск natefremova@gmail.com
Лаврик Ольга Ивановна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск proteomics@niboch.nsc.ru
Лактионов Павел Петрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск lakt@niboch.nsc.ru
Лалин Андрей Евгеньевич	ООО «ОПТЭК», Новосибирск office-nsk@zeiss.ru
Левашов Николай Александрович	Новосибирский государственный университет, Новосибирск kolyabasa@yabdex.ru
Легостаева Елена Викторовна	Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск lego@ispms.tsc.ru
Лифшиц Галина Израилевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск gl62@mail.ru
Логашенко Евгения Борисовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск evg_log@niboch.nsc.ru
Локтев Валерий Борисович	Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзор, Новосибирск valeryloktev@gmail.com

Маркель Аркадий Львович	Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск markel@bionet.nsc.ru
Матвеев Андрей Леонидович	Новосибирский государственный университет, Новосибирск tikunova@vector.nsc.ru
Махотин Алексей Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск makhotin@ngs.ru
Махотина Наталья Евгеньевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск nagornova@mail.ru
Мечетин Григорий Вениаминович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск mechetin@ngs.ru
Миронова Надежда Львовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск mironova@niboch.nsc.ru
Морозкин Евгений Сергеевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск morozkin@niboch.nsc.ru
Морозов Виталий Валерьевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск willis@ngs.ru
Морозова Елена Николаевна	ООО «ОПТЭК», Новосибирск morozova@zeiss.ru
Морозова Вера Витальевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск morozova@niboch.nsc.ru
Морозова Екатерина Александровна	Новосибирский институт органической химии им.Н.Н. Ворожцова, СО РАН, Новосибирск morozova@nioch.nsc.ru

Москалева Наталья Евгеньевна	ООО «Интерлаб», Москва nemoskaleva@gmail.com
Назаренко Нелли Николаевна	Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск nneli@ispms.tsc.ru
Невинский Георгий Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск nevinsky@niboch.nsc.ru
Непомнящих Татьяна Сергеевна	Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзор, Новосибирск antonec@ngs.ru
Новикова Яна Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск yandoc@mail.ru
Новопашина Дарья Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск danov@niboch.nsc.ru
Одинцова Елена Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск odintsoval@ngs.ru
Отпущенников Алексей Александрович	Центральная клиническая больница, урологическое отделение СО РАН, Новосибирск doctor_a@ngs.ru
Павлова Алла Викторовна	Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск alla.sudos@gmail.com
Пархоменко Таисия Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск tapar@yandex.ru
Патрушев Андрей Юрьевич	Центр Новых Медицинских Технологий в Академгородке Новосибирск peterswim@ngs.ru

Пермякова Валентина Ивановна	Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск v.i.permyakova@ngs.ru
Посух Ольга Леонидовна	Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск posukh@bionet.nsc.ru
Предтеченская Елена Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск elena_pred@mail.ru
Привалова Анна Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск anna.privalova@niboch.nsc.ru
Ребриков Денис Владимирович	Научно-производственная фирма «ДНК-Технология» Москва denis@dna-technology.ru
Репин Владимир Евгеньевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск ver@niboch.nsc.ru
Речкунова Надежда Ивановна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск nadyarec@niboch.nsc.ru
Рудиков Евгений Валерьевич	Научно-исследовательский институт психического здоровья СО РАМН, Томск Korvin_W@mail.ru
Рыкова Елена Юрьевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск rykova@niboch.nsc.ru
Рябинин Владимир Алексеевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск ryabinin@niboch.nsc.ru
Рябчикова Елена Геннадиевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск lenryab@yandex.ru

Савельева Любовь Анатольевна	Международный томографический центр, СО РАН, Новосибирск tibocat@ngs.ru
Савина Юлия Сергеевна	Новосибирский государственный университет Медицинский факультет, Новосибирск SavinaYuS@yandex.ru
Саттарова Евгения Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск esattarova@ngs.ru
Севостьянова Ксения Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск ksuss-vot@gorodok.net
Седых Сергей Евгеньевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск sedyh@niboch.nsc.ru
Сенькова Александра Васильевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины С ОРАН, Новосибирск alsenko@mail.ru
Сказов Роман Сергеевич	ООО «Спектроника» Москва skazov@spektronika.ru
Смирнова Людмила Павловна	НИИ психического здоровья СО РАМН, Томск lpsmirnova@yandex.ru
Соболева Светлана Евгеньевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск sb543@ngs.ru
Соколова Ольга Олеговна	НИИ молекулярной биологии и биофизики, СО РАМН, Новосибирск mark@soramn.ru
Солдатова Галина Сергеевна	Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск sgs@nm.ru

Тиванова Анастасия Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск kapuka541@yandex.ru
Тикунов Артем Юрьевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск arttik@ngs.ru
Тикунова Нина Викторовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск tikunova@niboch.nsc.ru
Тимофеева Надежда Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск na_timof@niboch.nsc.ru
Тулупов Андрей Александрович	Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск taa@tomo.nsc.ru
Тупикин Алексей Евгеньевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск altu@ngs.ru
Федорова Ольга Семеновна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск fedorova@niboch.nsc.ru
Филипенко Максим Леонидович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск max@niboch.nsc.ru
Фомин Александр Сергеевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск fomin_aleksandr@mail.ru
Хвостов Михаил Владимирович	Институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СОРАН, Новосибирск mihail.hvostov@gmail.com
Хлусевич Яна Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск khlusevichjana@mail.ru

Ходырева Светлана Николаевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск svetakh@niboch.nsc.ru
Цветовская Галина Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск cvetgalina@mail.ru
Челобанов Борис Павлович	Научно производственное объединение «БИОТЕСТ» Новосибирск chelobanov@biotst.ru
Черноловская Елена Леонидовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск Elena_ch@niboch.nsc.ru
Черноносков Александр Анатольевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск sandy@niboch.nsc.ru
Чернышев Владимир Викторович	Центральная клиническая больница, урологическое отделение СО РАН, Новосибирск doctor_a@ngs.ru
Шушарин Алексей Геннадьевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск shurin54@yandex.ru
Щербаков Дмитрий Николаевич	Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзор, Новосибирск molbiol@hotbox.ru
Яковец Екатерина Андреевна	Центр Новых Медицинских Технологий в Академгородке Новосибирск mann25@mail.ru
Якубонис Витас Антанасович	Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск yandoc@mail.ru



Иллюстрация на обложке:
Gerrit Dou
The Physician (1653) (фрагмент)
Kunsthistorisches Museum, Vienna

© Коллектив авторов, 2009
© Оформление, А. А. Черноносков, В. В. Коваль, 2009
© Рисунки на обложке, appler - Fotolia.com, 2009
Tryfonov - Fotolia.com, 2009
© ИХБФМ СО РАН, 2009

Сборник трудов научной конференции

Медицинская геномика и протеомика

9–13 сентября 2009
Новосибирск, Россия

Издание сборника осуществлено при поддержке РФФИ (грант № 09-04-06076-г)

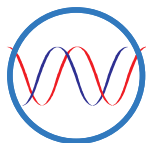
Рецензент
д.х.н., профессор Фёдорова О. С.

Подготовка оригинал-макета, редактирование
Черноносков А. А., Коваль В. В.

Дизайн обложки
Коваль В. В.

Ответственный за выпуск
Суторма В. А.
Корректор
Федотова Л. А.

Подписано в печать 20 августа 2009 г.
Формат 84×90/16. Гарнитура Ньютон. Печать цифровая
Тираж 130 экз.



ИХБФМ СО РАН