

Государственное образовательное учреждение
дополнительного профессионального образования
«Казанская Государственная Медицинская
Академия Федерального агентства по
здравоохранению и социальному развитию»
Kazan State Medical Academy

**МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ
«НОВЫЕ КОНЦЕПЦИИ МЕХАНИЗМОВ ВОСПАЛЕНИЯ,
АУТОИММУННОГО ОТВЕТА И РАЗВИТИЯ ОПУХОЛИ»
МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ**

**THE INTERNATIONAL MEETING
“NEW CONCEPTS ON THE MECHANISMS OF INFLAMMATION,
AUTOIMMUNITY AND TUMOROGENESIS”
CONFERENCE MATERIALS**

Казань 2011
Kazan 2011

УДК 616-006:616.66-002:57

ББК 55.6+53.17

Главный редактор

д.м.н., профессор К.Ш. Зыятдинов

Научный редактор

к.м.н, доцент М.А. Нюхнин

Редакционный совет:

к.м.н., с.н.с. М.И. Арлеевская, к.б.н., с.н.с.

А.Г. Габдулхакова, к.б.н. в.н.с. О.Д. Зинкевич, к.б.н., с.н.с.

Н.А. Сафина, м.н.с. Ю.В. Филина, м.н.с. И.М. Сайфуллин

Рецензенты:

к.б.н., доцент Т.А. Невзорова, д.м.н., профессор А.П. Цибульский

Международная научно-практическая конференция «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли». Материалы конференции / Под редакцией Зыятдинова К.Ш. - Казань: ИД «Меддок», 2011 –100 стр.

ISBN 978-5-9716-0055-8

© Казанская государственная медицинская академия, 2011
ISBN 978-5-9716-0055-8 © ООО «Издательский дом «Меддок», 2011

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ TNF- α И ЕГО РЕЦЕПТОРОВ КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФАКТОР НАРУШЕНИЯ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ПРИ АУТОИММУННОМ ТИРЕОИДИТЕ

Э.М. Биктагирова¹, Е. Н. Чухловина¹, Л.И. Саттарова²,
Г.Р. Вагапова³, З.И. Абрамова¹, О.А. Кравцова¹

¹ - ФГАУ ВПО Казанский (Приволжский) Федеральный
Университет, Кафедра биохимии, Казань, Россия

² - Межрегиональный клинико-диагностический центр,
Казань, Россия

³ - ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия,
Казань, Россия

elnarabik@gmail.com

Введение. Проблема аутоиммунного тиреоидита (АИТ) до настоящего времени остается актуальной, так как вопросы этиологии, патогенеза и диагностики не получили еще своего окончательного решения. К настоящему времени доказана роль апоптоза в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, в том числе и АИТ. Показано, что аутоантитела (ААТ) к ДНК являются мощными регуляторами апоптоза, скорость которого при АИТ многократно возрастает. Наряду с этим наиболее хорошо изучена последовательность событий, приводящих клетку к апоптозу в результате взаимодействия белков из семейства фактора некроза опухолей (TNF) со специфическими рецепторами. Согласно исследованиям последних лет, центральным патогенетическим звеном в развитии аутоиммунных эндокринных заболеваний служит частичный дефект иммунологического надзора, возникающий на фоне имеющейся генетической предрасположенности (такие как гены системы HLA, TNF- α и его рецепторов, и др.) под действием факторов окружающей среды.

Целью является исследование уровня антител к нативной (н) и денатурированной (д) ДНК, ДНК-гидролизующей активности в сыворотке крови здоровых и больных, как одного из факторов нарушения апоптоза при АИТ, а также его генетической составляющей, т.е. проведение анализа ассоциации полиморфизмов -308A/G гена TNF- α , I/D в 15 п.н. и +196T/G гена TNFR2; -609G/T и -1135C/T гена TNFR1.

Материалы и методы: уровень АТ к ДНК в сыворотке крови (больных АИТ - 137 женщин, без патологии ЩЖ - 161) определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), ДНК-гидролизующую активность анти-ДНК АТ – по превращению суперскрученной плазмиды рВR322 в кольцевую и линейную форму методом электрофореза. Генотипирование по полиморфным локусам было проведено с учетом активности аутоиммунного процесса, который оценивали по уровню антител к тиреопероксидазе (АТ к ТПО). Образцы ДНК получены из цельной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Анализ полиморфизмов генов осуществляли методом ПЦР с использованием аллель специфичных праймеров. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы UNPHASED 3.1.5, оценку ассоциаций полиморфизмов генов с помощью расчета относительного шанса (ОШ).

Результаты: В сыворотке крови больных АИТ присутствуют АТ как к нативной, так и к денатурированной ДНК, причем субстратная специфичность ДНК-абзимов направлена на одноцепочечную ДНК, что подтверждается достоверным увеличением содержания АТ к дДНК (*Me* для группы контроля – 0,79 (95%ДИ 0,34- 0,23); *Me* для группы больных АИТ – 0,94 (95%ДИ 0,41- 0,34)), по сравнению с контрольной группой. Показана прямая корреляционная зависимость между содержанием АТ к ТГ и АТ к н,дДНК ($R_s=0,381$ и $0,3$; $p=0,01$ (соответственно)), а также обратная – между уровнем АТ к ТПО и АТ к н,дДНК ($R_s=0,34$ и $0,44$; $p=0,01$ (соответственно)).

Аллель G ($P=8,17 \cdot 10^{-8}$, ОШ 3,18; ДИ_{ош} 2,0-4,9), генотипы GG ($P=0,0006$, ОШ 10,85; ДИ_{ош} 3,41-34,4) и AG ($P=0,005$, ОШ 3,52; ДИ_{ош} 1,92-6,4) по полиморфному локусу -308A/G гена TNF- α , являются маркерами генетической предрасположенности к АИТ, причем гетерозиготный генотип ассоциирован с умеренной выработкой АТ к ТПО ($P=0,018$, ОШ 2,89; ДИ_{ош} 1,4-5,8), генотип GG – АТ к ТГ ($P=0,05$, ОШ 3,16; ДИ_{ош} 1,2-8,31). Аллель А ($P=8,17 \cdot 10^{-8}$, ОШ 0,3; ДИ_{ош} 0,2-0,48) и генотип АА ($P=5,2 \cdot 10^{-7}$, ОШ 0,09; ДИ_{ош} 0,02-0,29) обладают защитными свойствами, снижая выработку данных АТ ($P=0,001$, ОШ 0,5; ДИ_{ош} 0,35-0,88; и $P=0,0008$, ОШ 0,27; ДИ_{ош} 0,1-0,7 (соответственно)).

Генотипы СС ($P=1,04 \cdot 10^{-8}$, ОШ 5,04; ДИ_{ош} 2,5-9,9) и DD ($P=0,01$, ОШ 1,41; ДИ_{ош} 0,59-3,36) полиморфизмов -1135 T/C, del 15 bp генов TNFR1 и 2 (соответственно) ассоциированы с предрасположенностью к АИТ среди женщин РТ, причем частота встречаемости гомозиготного генотипа СС значимо увеличена в группе больных с повышенным уровнем АТ к ТГ ($P=0,002$, ОШ 4,08; ДИ 1,6-10,4) и к ТПО ($P=0,0002$, ОШ 2,35; ДИ_{ош} 1,14-4,7), а I/I – АТ к ТПО ($P=0,03$, ОШ 1,03; ДИ_{ош} 0,2-3,8). Тогда как аллель Т ($P=4,85 \cdot 10^{-9}$, ОШ 0,35; ДИ_{ош} 0,24-0,5) и гетерозиготные генотипы I/D ($P=4,95 \cdot 10^{-5}$, ОШ 0,35; ДИ_{ош} 0,19-0,65), С/Т ($P=0,001$, ОШ 0,25; ДИ_{ош} 0,14-0,44) и гомозиготный ТТ ($P=0,002$, ОШ 0,19; ДИ_{ош} 0,1-0,39) этих же полиморфизмов обладают протективным действием, с пониженным уровнем содержания АТ к ТГ и ТПО.

Полиморфные локусы -609G/T +196T/G и генов TNFR1 и TNFR2 (соответственно) не ассоциированы с риском развития АИТ в данной выборке.

Выводы: полученные данные по изучению уровня и свойств АТ к ДНК при АИТ имеют практическую ценность при разработке современных методов иммунодиагностики и иммунотерапии. Результаты генотипирования могут служить основой для определения факторов риска развития данной патологии.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ КСИМЕДОНА И ДИМЕФОСФОНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Р.М. Газизов, Е.А. Ацель, Н.И. Бейлина, Л.Р. Газизова
ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия,
Казань, Россия
rugazizov@yandex.ru

Эффективность лекарственных средств (ЛС), обладающих иммунокорректирующим действием, при лечении больных хронической ревматической болезнью сердца (ХРБС) отмечается многими исследователями. Целью работы является сравнительная оценка эффективности отечественных оригинальных ЛС с имму-

номокорректирующим действием ксимедона и димефосфона при ХРБС.

Наблюдалось 290 больных ХРБС в возрасте от 20 до 69 лет, из них женщин - 223, мужчин - 67. Больные были подразделены на три группы: 74 больных I группы получали в течение трех недель традиционную терапию (ТТ); 109 больных II группы на фоне ТТ получали ежедневно ксимедон в таблетках по 0,5 г 3 раза в день в течение трех недель; 107 больных III группы на фоне ТТ получали димефосфон в течение 21 дня внутрь по 10-15 мл 15% раствора 3 раза в день. Для оценки эффективности лечения еженедельно в динамике определялись количество CD3⁺-Т-лимфоцитов, их субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов и их соотношение методом непрямого иммунофлюоресцентного анализа с использованием моноклональных антител; функциональная активность лимфоцитов в тесте РБТЛ на ФГА и в тесте Кона индуцированной супрессии; бактерицидная и цитотоксическая активность нейтрофилов в НСТ-тесте; уровень сывороточных иммуноглобулинов А, М, G.

Применение ксимедона на фоне ТТ у больных II группы способствовало увеличению сниженного количества CD3⁺- и CD4⁺- более чем в 1,5 раза, а CD8⁺- – в 1,8 раза; таким образом, происходило восстановление уровня CD4⁺- до нормы и нормализация иммунорегуляторного индекса CD4⁺-/CD8⁺-. При сравнении с показателями I (ТТ) группы наблюдалось достоверное различие в CD3⁺- и CD4⁺- с конца первой недели и CD8⁺ со второй недели ($p < 0,05$), при этом в I группе имелась отрицательная динамика показателей.

Применение димефосфона на фоне ТТ у больных III группы способствовало увеличению количества CD3⁺- и CD4⁺- в 1,3 раза, а CD8⁺- – в 1,6 раза; таким образом, происходило восстановление уровня CD4⁺- до нормы и нормализация иммунорегуляторного индекса CD4⁺-/CD8⁺-. При сравнении с показателями I группы наблюдалось достоверное различие в CD3⁺-, CD4⁺ и CD8⁺- с конца второй недели. Принципиально важным в действии ксимедона и димефосфона является способность увеличивать сниженное количество CD8⁺-, содержащих преимущественно супрессорные лимфоциты. Исследование супрессорной активности лимфоцитов в тесте Кона индуцированной супрессии по-

казало, что применение ксимедона и димефосфона на фоне ГТ приводило к нормализации не только количества супрессорных клеток, но и стимулировало их функциональную активность. Индекс супрессии во II и III группах увеличивался до уровня доноров к третьей неделе лечения, достоверно превышая показатель I группы уже с первой недели наблюдения ($p < 0,05$). Результаты исследования функциональной активности лимфоцитов в тесте РБТЛ с ФГА обнаружили активное стимулирующее действие ксимедона и димефосфона на угнетенные показатели иммунитета. Индекс стимуляции во II и III группах больных достоверно увеличивается на первой неделе лечения, превышая исходные данные к концу лечения на третьей неделе во II группе в 3 раза, а в III группе в 2,4 раза, оставаясь, однако, ниже уровня доноров.

При сравнительном изучении бактерицидной и цитотоксической активности нейтрофилов в НСТ-тесте при применении ксимедона в отличие от I группы к концу третьей недели выявлено достоверное снижение по сравнению с исходными данными показателя спонтанного НСТ-теста ($p < 0,05$) и более выраженное повышение показателя индуцированного НСТ-теста ($p < 0,05$). Показатель иНСТ во II группе к концу третьей недели был достоверно выше, чем в I группе. При этом оба показателя к концу третьей недели достигли контроля (соответственно $p > 0,05$ и $p > 0,05$). К концу третьей недели во II группе отмечено повышение в 1,7 раза (в I группе в 1,4 раза) коэффициента функциональной активности нейтрофилов (КАН) ($p < 0,05$) и в 1,8 раза (в I группе в 1,4 раза) - индекса стимуляции нейтрофилов (ИС) ($p < 0,05$), при этом показатели не отличались от контрольных ($p > 0,05$).

При изучении бактерицидной и цитотоксической активности нейтрофилов в НСТ-тесте при применении димефосфона к концу третьей недели выявлено недостоверное снижение по сравнению с исходными данными показателя сНСТ-теста ($p > 0,05$) и достоверное повышение показателя иСТ-теста ($p < 0,05$). Показатели сНСТ-теста и иНСТ-теста в III группе к концу третьей недели не отличались от данных больных I группы. При этом показатель сНСТ-теста к концу третьей недели достиг контроля ($p > 0,05$), а показатель иНСТ-теста оставался ниже контроля ($p < 0,05$). К концу третьей недели в III группе отмечено повышение в 1,5 раза коэффициента функциональной активности

нейтрофилов (КАН) ($p < 0,05$) и индекса стимуляции нейтрофилов (ИС) ($p < 0,05$), при этом показатели оставались достоверно ниже контрольных.

Применение ксимедона и димефосфона способствовало быстрому снижению повышенных титров IgA и IgM; во II и III группе количество этих иммуноглобулинов достоверно ниже чем в I группе со II недели лечения, а количество IgA достигает уровня доноров на II неделе ($p > 0,05$; $p > 0,05$). Исследование динамики IgG обнаружило нормализацию показателя во II группе к концу I недели лечения, а в III группе – к концу II недели лечения, в то время как в I группе различие с группой доноров возрастало в процессе лечения.

В комплексном лечении больных ХРБС рекомендуется применять методы иммунореабилитации, в том числе отечественные оригинальные лекарственные препараты ксимедон и димефосфон.

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА С ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ КСИМЕДОНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА ПОСЛЕ ПЕРВОНАЧАЛЬНОГО И ПОВТОРНОГО КУРСОВ ЛЕЧЕНИЯ

Р.М. Газизов, Е.А. Ацель, Н.И. Бейлина, Л.Р. Газизова
ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия,
Казань, Россия
rugazizov@yandex.ru

По данным многих исследователей при лечении больных хронической ревматической болезнью сердца (ХРБС) отмечается высокая эффективность препаратов, обладающих иммунокорректирующим действием (Гриневиц Ю.А., 1989; Передерин В.Г. и соавт., 1989; Караулов А.В., 1999; Земсков А.М. и соавт., 2008). В доступной литературе мы не обнаружили исследований, отражающих отдаленные результаты применения лекарственных средств с иммуномодулирующей активностью у больных хрони-

ческой ревматической болезнью сердца. В связи с этим представляет интерес изучение динамики показателей состояния иммунитета у больных ХРБС после первоначального и повторного курсов лечения отечественным иммуномодулирующим лекарственным средством ксимедон.

22 больным ХРБС через 6 мес после окончания курса комплексного противоревматического лечения с включением ксимедона проведен повторный 3-х недельный курс лечения ксимедоном. После окончания повторного курса лечения и через 6 мес определялись количество CD3+-Т-лимфоцитов, их субпопуляций CD4+- и CD8+-Т-лимфоцитов методом непрямого иммунофлюоресцентного анализа с использованием моноклональных антител; функциональная активность лимфоцитов в тесте РБТЛ на ФГА и в тесте КоНА индуцированной супрессии; уровень сывороточных иммуноглобулинов А, М, G.

По всем исследуемым показателям результаты повторного курса лечения ксимедоном превышали результаты I курса. Через 6 мес после повторного курса лечения ксимедоном количество CD3+-, CD4+- и CD8+-Т-лимфоцитов у больных ХРБС достоверно превышало показатели до начала I курса лечения и недостоверно превышало показатели через 6 мес после I курса лечения. Индекс супрессии и индекс стимуляции через 6 мес после повторного курса лечения были достоверно выше показателей до начала I курса лечения и через 6 мес после I курса лечения. Уровни IgA и IgM через 6 мес после повторного курса лечения оставались достоверно ниже показателей до начала I курса лечения и недостоверно ниже показателей через 6 мес после I курса лечения, а уровень IgG - недостоверно выше показателя до начала I курса лечения и через 6 мес после I курса лечения.

Влияние ксимедона на состояние иммунитета больных ХРБС после повторного курса было более выраженным, чем после I курса. Остаточный иммунокорректирующий эффект ксимедона через 6 мес после повторного курса практически по всем параметрам был несколько выше остаточного эффекта комплексной терапии с включением ксимедона.

КОНСТРУИРОВАНИЕ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛ К ДНК С ЗОЛОТЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ И ОЦЕНКА ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Э.И. Галямутдинова, Т.А. Невзорова
ФГАУ ВПО Казанский (Приволжский) Федеральный
Университет, Кафедра биохимии, Казань, Россия
amandi@list.ru

Антитела к ДНК (АТ к ДНК) являются маркерами различных аутоиммунных заболеваний, и они могут выполнять патологическую роль в развитии и прогрессировании этих заболеваний. До настоящего времени механизмы влияния АТ к ДНК на клетки не известны.

Для изучения механизма взаимодействия и визуализации проникновения АТ к ДНК в клетки необходимо присоединить к АТ зонды. В качестве зондов могут выступать различные наночастицы благородных металлов, но наиболее легкими в получении, стабильными и обладающими биосовместимостью являются золотые наночастицы.

Целью работы явилось конструирование конъюгатов антител к ДНК с золотыми наночастицами и оценка их биологической активности в культуре клеток *in vitro*.

Золотые наночастицы со средним диаметром 54 нм были получены восстановлением золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. После оптимизации условий были получены конъюгаты золотых наночастиц с основными АТ к ДНК класса IgG больных СКВ, РА и здорового донора.

В дальнейшем исследовали влияние полученных конъюгатов на жизнеспособность и метаболизм в культурах клеток СПЭВ, МДСК и на моноцитах здорового донора. Морфологию клеток исследовали оптической, флуоресцентной, атомно-силовой микроскопией.

Было показано, что происходит изменение метаболизма клеток, инкубированных с конъюгатами золотых наночастиц с АТ к ДНК в отличие от контролей.

Полученные результаты обсуждаются в докладе.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ АЛЬФА ИНТЕРФЕРОНА НА КИСЛОРОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ГЕПАТИТОМ С (EX-VIVO)

Н.О. Зинкевич¹, Ю.М. Созинова¹, С.В. Ткачёва¹,
И.М. Сайфуллин²

¹ – ГОУ ВПО Казанский Государственный
Медицинский Университет, Казань, Россия

² – ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская
Академия, Казань, Россия
zinkevich_oleg@mail.ru

Введение. Одним из наиболее частых осложнений комбинированной противовирусной терапии больных инфекционным гепатитом С являются обострение хронических воспалительных заболеваний и возникновение новых очагов воспаления, которые требуют от врача прекратить лечение, или уменьшить дозы препарата, что существенно снижает эффективность лечения. Поскольку первым и наиболее мощным механизмом защиты организма от инфекций, вызывающих воспаление, является опсонофагоцитоз нейтрофилами, мы решили изучить, как меняется функция кислородного метаболизма этого звена защиты при антивирусной терапии.

Цель исследования: изучить ex-vivo влияние препаратов альфа-интерферона на реактивность нейтрофилов в реакции люминол-зависимой хемилюминисценции (ХЛ) у пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) во время комбинированной противовирусной терапии (КПВТ).

Материал и методы исследования. Обследовано 86 пациентов с ХГС (54 мужчин, 32 женщины) на разных сроках лечения. Всем пациентам проводила КПВТ. Изучали спонтанную и индуцированную люминол-зависимую хемилюминисценцию нейтрофилов, выделенных из периферической крови седиментацией в растворе декстрана Т-500. В качестве стимула использовали вакцину золотистого стафилококка, опсонизированную пулливированной сывороткой. Для изучения прямого действия альфа-интерферона на функциональную активность ПМНЛ в реакционную среду вносился используемый в терапии препарат в терапев-

тической концентрации в расчёте на кг веса. Для оценки реактивности нейтрофилов учитывали пик в имп/мин, время наступления пика в сек. и общее количество импульсов позволяющих оценить весь микробицидный потенциал клеток, связанный с активными формами кислорода. Расчёт проводили на 100 000 нейтрофилов.

Результаты. В целом реактивность нейтрофилов пациентов была различной и не отмечено зависимости от сроков терапии 1142400 ± 67800 имп/мин. (колебания от 357400 до 2171100 имп/мин/100 тыс. ПМНЛ). Среднее время наступления пика равно $400 \pm 34,46$ сек (колебания от 120 до 820 сек). Светосумма равнялась 12021111 ± 1011880 имп./100 000 лейкоцитов с колебаниями от 4 050 000 до 31 870 000 импульсов. При добавлении в реакционную среду реакция нейтрофилов на стимул разделилась на три типа ответа. В первую группу вошли пациенты, у которых добавление интерферона вызывало усиление ХЛ-ответа, во второй уменьшение ответа нейтрофилов в присутствии интерферона и третья группа не реагировала на интерферон.

В первую группу (N=28) время пика без интерферона составило 512 ± 75 сек, с интерфероном 460 ± 77 сек ($p=0,40$). Пик без интерферона составил 840330 ± 98576 имп/мин, с интерфероном – $1\ 279\ 810 \pm 148\ 471$ имп./мин ($p=0,034$). Общая светосумма без интерферона $13\ 786\ 000 \pm 2\ 110\ 690$ имп., с интерфероном – $10\ 523\ 000 \pm 2\ 037\ 525$ имп. ($p=0,0798$). Достоверные различия выявлены только по величине пика.

Вторая группа (N=24), отвечающая понижением реактивности нейтрофилов в присутствии интерферона имела следующие параметры. Время наступления пика - $441,8 \pm 64,6$ сек. без интерферона, с интерфероном - $406,4 \pm 61,1$ сек. ($p=0,55$). Пик без интерферона составил $1\ 283\ 100 \pm 130137$ имп/мин., с интерфероном – $934\ 982 \pm 84\ 879$ имп/мин. ($p=0,000147$). Светосумма без интерферона – $14\ 392\ 727 \pm 2\ 303\ 110$, с интерфероном – $10\ 220\ 000 \pm 1\ 351\ 843$ имп. ($p=0,0056$).

Третья группа (N=34), нейтрофилы, которых не реагировали на присутствие интерферона, имела следующие показатели: время пика без интерферона $305 \pm 33,5$ сек., с интерфероном - $336 \pm 44,9$ сек. ($p=0,296$); пик без интерферона составил $1\ 201\ 214 \pm 89606$ имп/мин, с интерфероном – $1\ 191\ 086 \pm 87163$ имп/мин ($p=0,64$); светосумма без интерферона – $11\ 132\ 143 \pm 1\ 070\ 098$

имп., с интерфероном – $11\,278\,571 \pm 1397263$ имп. ($p=0,839$). Таким образом, в третьей группе не выявлено достоверных различий ни по одному параметру.

На наш взгляд такое распределение реактивности нейтрофилов пациентов находящихся на противовирусной терапии представляет определённый клинический интерес и нуждается в дальнейшем изучении. При повышенной реактивности нейтрофилов в присутствии интерферона (аналогично условиям *in-vivo* после инъекции интерферона) возможны обострения хронических воспалительных заболеваний, так как такая гиперреактивность, как правило, сопровождается выбросом лизосомальных гранул и приводит к повреждению тканей в очагах воспаления со всеми клиническими последствиями. С другой стороны снижение реактивности нейтрофилов в присутствии интерферона уменьшает защитный, микробицидный потенциал этого клеточного звена и может явиться условием более тяжелого протекания сопутствующих заболеваний и возникновению новых очагов воспаления.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЕСТЕСТВЕННЫХ АУТОАНТИТЕЛ К ПОЧЕЧНЫМ АНТИГЕНАМ У ДЕТЕЙ

С.В. Мальцев, Г.Ш. Мансурова

ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия,
Казань, Россия
gsm98@mail.ru

Диагностика пиелонефрита (ПН) у детей первых месяцев жизни и, особенно у новорожденных, представляет известные трудности в связи с малосимптомностью и неспецифичностью клинической картины. Более чем у 2/3 детей ПН выявляется только при целенаправленном исследовании, что свидетельствует о большой частоте латентного течения ПН у детей раннего возраста. Известно, что дистрофические и деструктивные изменения клеток паренхимы почек возникают задолго до клинической манифестации ПН. В нашей работе изучались изменения в содержании аутоантител (ауто-АТ) к белкам почечной паренхимы как

ранний доклинический признак патологического процесса в почках у детей с высоким риском развития ПН.

Цель исследования: изучить нарушения в продукции естественных ауто-АТ к почечным антигенам на раннем доклиническом этапе у детей первых лет жизни из группы риска по развитию ПН.

Под наблюдением находились 56 детей с рождения до 3 лет жизни. Все дети были рождены от матерей с гестационным ПН и отягощенным акушерским анамнезом, что является фактором высокого риска развития ПН у детей. Контрольную группу составили 25 детей, рожденных у здоровых матерей без признаков заболеваний органов мочевой системы. У всех детей в сыворотке крови дважды определялся уровень естественных ауто-АТ класса IgG к белкам паренхимы почек - KiM-05-40, KiM-05-300, KiS-07-120 с использованием иммуноферментных тест-систем ЭЛИ-ТЕСТ.

Среди новорожденных детей 37,5% уже к рождению имели аномально высокий уровень ауто-АТ к почечным антигенам. Одновременное повышение уровней всех исследуемых ауто-АТ выявлено у большинства детей (71,4%). При повторном исследовании в 6 месяцев общая численность детей с повышенным уровнем ауто-АТ возросла до 53,8%. Важно, что у всех детей, имевших патологические титры ауто-АТ при рождении, и в 6 месяцев сохранялись высокие уровни тех же ауто-АТ. Установлена достоверная прямая связь концентрации ауто-АТ к почечным белкам в периоде новорожденности ($r=+0,86$) и наличия гестационного ПН у матери. Все дети из группы с патологически высокими значениями при рождении имели достоверно повышенный уровень естественных ауто-АТ к антигенам почек в дальнейшем. За период наблюдения в течение 3 лет среди пациентов, имевших высокие значения ауто-АТ к почечным антигенам при рождении, частота заболевания ПН среди них составила 90,4%.

Заключение: избыточное содержание естественных ауто-АТ к почечным антигенам в сыворотке крови у новорожденных детей может служить прогностическим доклиническим признаком развития ПН для формирования групп риска.

ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ОБОСНОВАННЫЙ ПОДХОД К ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЦЕРВИЦИТА И ВПЧ-ИНФЕКЦИИ.

Л.И. Мальцева, Л.Н. Фаррахова

ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия,
Кафедра акушерства и гинекологии №1, Казань, Россия
lifara@mail.ru

Актуальность проблемы терапии хронических цервицитов на сегодняшний день чрезвычайно велика. Этиологическую роль в инициации воспалительных процессов шейки матки играют различные вирусные и микробные агенты, но наличие и знание возбудителя не всегда определяет эффект лечения, что связано со сложными механизмами реализации инфекции. При активной репродукции ВПЧ происходит усиленное образование в инфицированных клетках «агрессивного» метаболита 16 α -гидроксиэстрогена, при этом снижается эффективность лечения препаратами интерферона за счет блокады противовирусной иммунологической защиты.

Целью исследования явился выбор дифференцированной комплексной терапии хронического цервицита у женщин в зависимости от степени нарушения соотношения метаболитов эстрогена и характера выявленной инфекции.

Было обследовано 180 пациенток с хроническим цервицитом. Проведено общеклиническое обследование, ПЦР-диагностика специфических инфекций, традиционная и жидкостная цитология мазков из экто- и эндоцервикса, кольпоскопия, количественное определение соотношения метаболитов 2-гидроксиэстрогена к 16 α -гидроксиэстронону (2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1) в моче с помощью набора ESTRAMET (ИФА-метод).

ВПЧ-инфекция была обнаружена у 38 (21%) женщин, из них у 3 - в ассоциации с хламидийной, у 6 - с уреа-плазменной, у 5 - с микоплазменной, у 5 - с ВПГ и ЦМВ-инфекцией, у 7 - с грибами рода *Candida*, у 16 - сочетание ВПЧ-инфекции и бактериальной условно-патогенной флоры. Монохламидийная инфекция выявлена у 6 больных, у 21 - мико-уреаплазменная, у 30 - в сочетании с условно-патогенной флорой. По итогам жидкостного цитологического исследования у 44 женщин выявлена дисплазия эпителия шейки матки (у 19 - CIN I, 15- CIN II, 10 - CIN III). У 75 женщин

с хроническим цервицитом и ВПЧ-инфекцией обнаружены нормальные показатели соотношения 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ. У 105 пациенток уровень метаболитов эстрогена был нарушен с преобладанием 16 α -ОНЕ1, что выражалось в снижении показателей до 0,2. Лечение проводилось дифференцированно: у больных без нарушенного обмена метаболитов эстрогена были использованы антисептики (гексикон, бетедин) в сочетании с индукторами интерферонов (лавомакс, генферон и др.), а также препараты, коррегирующие биоценоз влагалища. При обнаружении хламидий, микоплазм и уреаплазм более 10⁴ КОЕ проводилась антибактериальная терапия. Всем больным со сниженными показателями соотношения метаболитов эстрогена 2ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 лечение начинали с назначения препарата промисан по 2 капсулы 2 раза в день до 6 месяцев, местного применения антисептиков и терапии сопутствующей инфекции. Противовирусные препараты и индукторы интерферонов применялись с третьего месяца использования промисана. Пациентки со сниженными показателями 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 в моче были повторно обследованы на соотношение метаболитов эстрадиола для оценки эффективности проведенной терапии и определения курса лечения промисаном. Положительный клинический эффект был получен у всех больных: удалось добиться нормализации обмена эстрогенов и элиминации ВПЧ-инфекции. У женщин с выраженной регрессией дисплазии наблюдалось значительное изменение концентраций метаболитов эстрадиола в сторону 2-ОНЕ1. Кольпоскопически и цитологически картина воспаления сохранилась у 8 % пациенток, что потребовало дополнительной терапии.

Таким образом, определение соотношения метаболитов эстрогена 2ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 в моче позволяет дифференцированно подойти к лечению больных с хроническим цервицитом и обоснованно использовать промисан в составе комплексной терапии, в связи с его высокой эффективностью и хорошей переносимостью.

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ОНКОМАРКЕРА P16 *ink4 α* НА ОСНОВЕ ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ РАННИХ ФОРМ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМ ЦЕРВИЦИТОМ И ВПЧ-ИНФЕКЦИЕЙ.

Л.И. Мальцева, Л.Н.Фаррахова

ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия,
Кафедра акушерства и гинекологии №1, Казань, Россия
lifara@mail.ru

Рак шейки матки занимает второе место по распространенности среди онкологических заболеваний в мире и первое место среди причин женской смертности от рака в развивающихся странах. Известно, что этиологическим фактором развития рака шейки матки является персистенция высокоонкогенных типов ВПЧ. Механизм канцерогенеза начинает работать в случае интеграции вируса в геном клетки, что сопровождается активацией синтеза онкобелков E6 и E7. Существует киназа E2P, которая обеспечивает прохождение клетки из G1 в S фазу клеточного цикла. В норме она неактивна, находясь в связанном состоянии с белком супрессором Rb. Белок p16ink4a осуществляет контроль разобщения комплекса E2F-Rb, не допуская безудержной пролиферации клетки. Белок E7 вируса папилломы человека 16, 18 типов при своем взаимодействии с продуктом гена ретинобластомы приводит к разобщению комплекса E2F-Rb. E2P остается постоянно в активном состоянии, стимулируя безудержную пролиферацию клетки. Белок p16ink4a пытается сдержать пролиферацию клетки, что приводит к постоянному его синтезу. Сверхэкспрессия p16ink4a и его накопление в цитоплазме является признаком поражения шейки матки и может служить ранним маркером рака шейки матки.

Целью работы явилась ранняя диагностика неинвазивного рака шейки матки у женщин с помощью жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования экспрессии онкобелка p16ink4a.

Нами было обследовано 547 женщин репродуктивного возраста с признаками хронического экзо- и эндоцервицита и ВПЧ-инфекцией. Помимо общеклинического обследования были про-

ведены культуральное исследование, ПЦР-диагностика специфических инфекций (ВПЧ, ВПГ, ЦМВ, хламидий, микоплазм, уреаплазм), жидкостная цитология эндо- и экзоцервикса, расширенная кольпоскопия, морфологическое исследование прицельно взятого биоптата, иммуноцитохимическое исследование мазков на белок p16 ink4a при помощи моноклональных антител («AbCam», UK).

Анализ сопутствующей флоры цервикального канала показал, что чаще папилломавирусную инфекцию сопровождали хламидии 7,6% женщин, уреаплазмы - 13,2%, микоплазмы - 10,3%, вирусы герпеса - 8%, ЦМВ - 2%, у 50% - выявлено сочетание ВПЧ-инфекции и другой условно-патогенной флоры. По результатам жидкостной цитологии у 169 (31%) женщин выявлена дисплазия различной степени: у 68 - CIN I, 58 - CIN II, 43 – CIN III. Белок p16ink4a был обнаружен у 65 (8,4%) женщин и только у больных с дисплазией (у 12 - с дисплазией I степени, у 15 - II степени, у 38 - III степени). Остальные 104 женщины имели негативную реакцию на p16ink4a. Больным с позитивной реакцией на p16ink4a независимо от степени дисплазии была проведена электроэксцизия шейки матки с целью расширенной биопсии и лечения. После гистологического исследования биоптата подтвержден Ca in situ шейки матки.

Таким образом, белок p16ink4a является надежным маркером, позволяющий достоверно оценивать потенциал дисплазии в отношении развития рака шейки матки и выбирать консервативную или оперативную тактику лечения. Тест на белок p16 ink4a является дополнительным тестом для ранней диагностики рака шейки матки.

ТЕРАПИЯ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫХ ХРОНИЧЕСКИХ ЭКЗО-И ЭНДОЦЕРВИЦИТОВ У ЖЕНЩИН

Л.И. Мальцева, Л.Н. Фаррахова

ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия,
Кафедра акушерства и гинекологии №1, Казань, Россия

lifara@mail.ru

Цель: оценить эффективность ферровира в лечении ВПЧ у женщин с хроническим цервицитом в сравнении с индуктором интерферона генфероном.

Обследовано 28 женщин с признаками хронического цервицита и ВПЧ-инфекцией. Проведено общеклиническое, культуральное исследование, ПЦР-диагностика специфических инфекций, цитологическое исследование мазков из шейки матки, расширенная кольпоскопия, морфологическое исследование прицельно взятого биоптата. По виду терапии все пациентки были разделены на 2 группы. В первую вошли 15 женщины, которые наряду с антисептиками (гексикон, бетадин и т.п.), антибактериальными и восстанавливающими биоциноз влагалища препаратами получали индуктор интерферона генферон. Во второй группе 13 пациенток - в сочетании с препаратом Ферровир (по 5,0 мл 1,5% раствора, внутримышечно 1 раз в сутки, с интервалом в 72 часа, курс - 10 инъекций). Эффективность терапии оценивалась дважды: через 6 и 12 месяцев после окончания лечения с применением расширенной кольпоскопии, цитологии и ПЦР-типирования.

Положительный клинический эффект был получен у всех больных. Через 6 месяцев после окончания лечения ВПЧ-инфекция выявлялась у 5 пациенток первой группы, а через 12 месяцев папилломавирус был обнаружен уже у 8 женщин. У пациенток второй группы - 100% элиминации вируса.

Таким образом, применение ферровира позволяет добиться лучших результатов лечения и отсутствия рецидивов ВПЧ-инфекции, что позволяет применять его в качестве иммуномодулирующего и противовирусного средства без использования препаратов интерферона.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ (eNOS) И РАЗВИТИЕ ГЕСТОЗА У ПЕРВОРОДЯЩИХ ЖЕНЩИН

Л.И. Мальцева, Т.В. Павлова

ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия,
Казань, Россия

Tatjana-pavlova136@rambler.ru

Гестоз – одно из наиболее распространенных осложнений беременности, причины которого до сих пор четко не обозначены. Частота гестоза в России достигает 20%. Существуют данные, свидетельствующие о наличии генетической предрасположенности к развитию этого осложнения беременности.

К генетическим факторам, с которыми может ассоциироваться гестоз, относят гены MTHFR, его вариант MTHFR-C677T, AGT-M235T, ACE I/D, ген протромбина, NO-синтазы, мутация V фактора Лейдена, дефицит протеина C, S и др.

Оксид азота является основным эндотелиальным фактором релаксации, участвующим в поддержании тонуса сосудистой стенки, тромбогенезе. Функция NO состоит в снижении активности сократительного аппарата гладкомышечных элементов сосудов, торможении адгезии циркулирующих тромбоцитов и лейкоцитов к эндотелию, регуляции пристеночного гемостаза. В синтезе NO в эндотелии и, следовательно, в регуляции сосудистого тонуса, кровотока и артериального давления участвует конституциональная эндотелиальная NO-синтаза 3-го типа (NOS3, синоним eNOS).

Эндотелиальный гипотензивный фактор – оксид азота (NO) является продуктом эндотелиальной NO-синтазы, которая кодируется геном NOS3 (eNOS). Аллельные варианты этого гена приводят к снижению уровня экспрессии NO-синтазы и, как следствие, снижению устойчивости организма к гипертензивным влияниям со стороны внешней и внутренней среды.

Полиморфизм генов NO-синтазы связан с различными акушерскими патологиями, в основе которых лежат изменения сосудистого тонуса (гестоз, плацентарная недостаточность, ЗВУР плода).

Особенно непредсказуем гестоз у первородящих женщин и его связь с генетическими факторами чрезвычайно интересна. В связи с этим, целью исследования явилось изучение ассоциации функционально значимых полиморфных вариантов гена эндотелиальной NO-синтазы с развитием гестоза у первородящих женщин.

Материалы и методы: обследованы 108 первородящих женщин на сроках 27-37 нед.: из них 38 беременных с гестозом разной степени тяжести (20 - легкой, 10 - средней, 8 - тяжелой); 50 - из группы высокого риска развития гестоза: с ожирением – 10, нейроциркуляторной дистонией по гипертоническому типу (НЦД) – 17, пиелонефритом – 23 и 20 практически здоровых первородящих женщин.

У всех пациенток, кроме общеклинического обследования, исследовали кровь для детекции полиморфизма E298D с помощью рестрикционного анализа и полиморфизма 4a/4b в гене NOS3. Ген NOS3-E298D, 4a/4b ответственный за синтез фермента – эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), которая участвует в синтезе оксида азота эндотелием и, следовательно, в регуляции сосудистого тонуса, кровотока и АД.

Результаты исследования показали, что в контрольной группе были обнаружены нормальные варианты гена eNOS3-E298E, 4b/4b у всех беременных.

У женщин из группы риска выявлен полиморфизм гена NOS3-E298D, 4a/4b, где аллели D и 4a увеличивают риск развития акушерской патологии, таких как гестоз, плацентарная недостаточность, ЗВУР, но только при наличии потенцирующих факторов.

В отличие от женщин группы риска у беременных с гестозом были обнаружены мутантные полиморфные варианты гена eNOS3.

У 10 больных с легким гестозом обнаружен мутантный вариант гена по аллеле D – NOS3-D298D, 4b/4b, клинически все они имели ЗВУР плода, маловодие.

Женщины с гестозом средней и тяжелой степени имели мутантный вариант гена по аллеле 4a – NOS3-4a/4a, что сопровождалось более ранним появлением отеков, протеинурии и активным течением ДВС-синдрома. Из них одна беременная с гестозом

средней степени и две с тяжелым гестозом имели еще и гомозиготную форму D298D полиморфизма гена NOS3. При гестозе средней и тяжелой степени клинически определялся ЗВУР плода II – III степени, раннее и тяжелое течение гестоза.

Исследования показали, что генотипу 4b/4b соответствует максимально высокий уровень базального NO, тогда как у женщин с генотипом 4a/4a уровень NO в 2 раза ниже. Гетерозиготные формы мутации занимают промежуточное положение по уровню NO.

Выводы: Полиморфизм в интроне 4 гена NOS3-E298D, 4a/4b, связан с повышенным риском развития гестоза. Среди женщин с гестозом, у носителей хотя бы одного аллеля 4a, отмечалось более высокое АД, а у пациенток с генотипом 4a/4a – обнаружена связь с более ранним и более тяжелым гестозом, гипоксией и ЗВУР плода. Полиморфные варианты гена эндотелиальной NO-синтазы ассоциированы с развитием акушерской патологии, такой как гестоз, плацентарная недостаточность, ЗВУР.

Выявление данного полиморфизма имеет наиболее важное значение на ранних сроках беременности. Возможность ранней досимптоматической диагностики любой акушерской патологии позволяет провести профилактическое лечение и не даст гестозу реализоваться.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ГЕСТОЗУ У ПЕРВОРОДЯЩИХ ЖЕНЩИН

Л.И. Мальцева, Т.В. Павлова

ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия,
Казань, Россия

Tatjana-pavlova136@rambler.ru

Гестоз остается наиболее тяжелым осложнением беременности с неизученными до конца этиологией и патогенезом, отсутствием радикальных методов лечения. Хорошо известна большая группа риска по развитию гестоза (гипертензивные состояния, болезни почек, ожирение). Среди них наибольший удельный вес занимают больные с патологией почек. На сего-

дняшний день огромное значение придается генетическим факторам.

К генетическим факторам, с которыми может ассоциироваться гестоз, относят гены MTHFR, его вариант MTHFR-C677T, AGT-M235T, ACE I/D, ген протромбина, NO-синтазы, мутация V фактора Лейдена, дефицит протеина C, S и др.

Описано две разновидности гена метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR – обозначаемые как мутация C677T. У лиц, гомозиготных по данной мутации, отмечается термолабильность MTHFR и снижение активности фермента примерно до 35% от среднего значения. Такая мутация сопровождается повышением уровня гомоцистеина крови, что является риском развития нефропатии у беременных. Другой важный аспект мутации MTHFR-C677T – фолат-дефицитная анемия, которая дополнительно усугубляет гипоксию, течение диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови и, тем самым, способствует прогрессированию микроциркуляторных расстройств и утяжелению гестоза.

Большое значение в развитии гестоза имеют генотипы ангиотензиногена – AGT-M235T. Мутация меняет взаимодействие ангиотензиногена с ренином и ангиотензинпревращающим ферментом, что может вызвать развитие гестоза у беременных – носителей мутации.

В последние годы открыто существование вариантов генотипа ангиотензинпревращающего фермента – ACE I/D. У пациентов, гомозиготных по аллели D, уровень ангиотензинпревращающего фермента в 2 раза превышает уровень фермента у гомозиготных по аллели I. Полиморфизм гена ACE I/D и AGT-M235T слабо связан с частотой и течением хронической артериальной гипертензии вне беременности, но может быть фактором риска развития гипертензии у беременных.

Очевидно, что гестоз имеет целый ряд генов предрасположенности, поэтому выявление генов – кандидатов, предрасполагающих к развитию гестоза, может помочь в определении группы риска и проведении эффективной профилактики этой тяжелой патологии. Особенно непредсказуем гестоз у первородящих женщин и его связь с генетическими факторами чрезвычайно интересна. В связи с этим, целью исследования явилось изучение роли

некоторых генетических факторов в развитии гестоза у первородящих женщин.

Обследованы 148 первородящих женщин на сроках 27-38 нед.: из них, 60 беременных с разной степенью тяжести гестоза (35 - легкой, 15 - средней, 10 - тяжелой); 68 женщин без клиники гестоза, но из группы высокого риска: с ожирением – 10, гипертоническим синдромом – 18, пиелонефритом – 40; 20 – практически здоровых первородящих женщин.

У всех пациенток, кроме общеклинического обследования с оценкой гемостазиограммы (агрегация тромбоцитов: спонтанная и индуцированная; уровень фибриногена, АЧТВ, МНО, 12а зависимого фибринолиза, АТ III, РКМФ, ПДФ, пламиноген, определение протеина С и S), исследовали кровь методом ПЦР в реальном времени по детекции полиморфизма генов AGT-M235T (ангиотензиногена), ACE I/D (ангиотензинпревращающего фермента), MTHFR-C677T (метилентетрагидрофолатредуктазы). Исследуемые гены оценивали со всеми вариантами их мутаций (AGT-T235T, ACE D/D, MTHFR-T677T). Методом иммунохемилюминисцентного анализа (ИХА) определяли уровень фолиевой кислоты (ФК), ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) и ренин – ангиотензина (РА).

В контрольной группе первородящих женщин молекулярно-генетическое исследование выявило наличие нормальных вариантов исследуемых генов и РА, АПФ. Уровень ФК был снижен на 15% от нормы у 8 из 20 беременных.

В группе риска – у беременных с ожирением установлен мутантный вариант MTHFR-T677T с незначительным снижением ФК и повышением АПФ. У одной из них был обнаружен малый порок развития плода (незаращение неба – «волчья пасть»). Мутантный вариант MTHFR-T677T также выявлен у всех женщин с гипертоническим синдромом, у одной из них – в сочетании с мутантным вариантом полиморфизма гена ACE D/D и незначительное повышение уровня РА. У 19 женщин с пиелонефритом обнаружен мутантный вариант полиморфизма гена ACE D/D, двукратное повышение уровня РА, незначительное снижение ФК, при этом в гемостазиограмме отмечено незначительное повышение пламиногена и фибриногена.

У беременных с гестозом мутация изучаемых генов всегда сочеталась с резким снижением уровня ФК и значительным повышением РА.

В основной группе у 12 беременных с легким гестозом обнаружены мутантные гены: у 5 – МТНFR-T677T, у 7 – ACE D/D, у одной женщины – сочетание этих двух мутантных вариантов. У всех беременных наблюдались изменения в коагулограмме в виде повышения содержания плазминогена и фибриногена.

Среди женщин с гестозом средней степени тяжести: у 8 установлен мутантный ген ACE D/D, у 7 – МТНFR-T677T. При исследовании гемостаза выявлено незначительное повышение Д-димера, плазминогена и фибриногена.

Все беременные с тяжелым гестозом имели сочетание двух мутантных вариантов генов ACE D/D и МТНFR-T677T, двухкратное повышение АПФ. При этом отмечено трехкратное увеличение Д-димера, гиперфибриногенемия, значительная гиперагрегация тромбоцитов, гиперкоагуляция, снижение АТ-III, что подтверждало активно текущий ДВС-синдром.

У пациенток, имеющих мутации в гене МТНFR, помимо гестоза, клинически наблюдали ЗВУР плода, у двух из них была частичная отслойка нормально расположенной плаценты на сроках 27 и 37 нед. беременности.

Экспрессия мутантных генов со снижением ФК и повышением РА всегда сопровождалась нарушением в системе гемостаза и гипертензивным синдромом разной степени тяжести. Начальные признаки ДВС-синдрома были отмечены при легком и среднетяжелом течении гестоза, выраженный хронический ДВС-синдром – при тяжелом течении гестоза.

Выводы: Развитие гестоза у первородящих женщин, вероятнее всего, генетически детерминировано; фолатдефицитные состояния являются дополнительными, потенцирующими патологию, факторами.

Выявленные особенности определяют особые подходы к профилактике и лечению гестоза у первородящих женщин.

ПОЛИМОРФИЗМ МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ И ДЕФИЦИТ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ КАК ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ГЕСТОЗА У ПЕРВОРОДЯЩИХ ЖЕНЩИН

Л.И. Мальцева, Т.В. Павлова

ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия,
Казань, Россия

Tatjana-pavlova136@rambler.ru

Одной из актуальных проблем современного акушерства является проблема гестоза, причины возникновения которого четко не обозначены. Существуют данные, свидетельствующие о наличии генетической предрасположенности к развитию гестоза. Особенно непредсказуем гестоз у первородящих женщин.

За последние годы изучена группа генов, принимающих участие в метаболизме фолиевой кислоты. Высокие концентрации активной формы фолиевой кислоты необходимы для превращения избытка гомоцистеина в метионин. В фолатном цикле задействованы разные ферменты. Основной из них, обеспечивающей превращение фолиевой кислоты на этапах цикла, является метилентетрагидрофолатредуктаза. Снижение активности этого фермента – одна из причин накопления гомоцистеина в организме, который повреждающе действует на эндотелий сосудов и стимулирует тромбообразование. Это приводит к нарушению плацентации и расстройствам фетоплацентарного кровообращения, на поздних сроках беременности – плацентарной недостаточности, задержке внутриутробного развития и хронической гипоксии плода. Одним из важных факторов, способствующих увеличению уровня гомоцистеина в крови, может быть наследственная предрасположенность.

Полиморфизм гена метилентетрагидрофолатредуктазы наиболее изучен. Описано две разновидности гена метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR – обозначаемые как мутация C677T. У лиц, гомозиготных по данной мутации, отмечается термоллабильность MTHFR и снижение активности фермента примерно до 35% от среднего значения. Такая мутация сопровождается повышением уровня гомоцистеина крови, что является

риском развития нефропатии у беременных. Повышение частоты аллеля 677T было отмечено не только при гестозе, но и при других осложнениях беременности (отслойке плаценты, задержке роста плода, антенатальной смерти плода, дефекты развития нервной трубки плода, «заячья губа», «волчья пасть»). Другой важный аспект мутации МТНFR-С677Т–фолат-дефицитная анемия, которая дополнительно усугубляет гипоксию, течение диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови и, тем самым, способствует прогрессированию микроциркуляторных расстройств и утяжелению гестоза.

В связи с этим, целью исследования явилось изучить роль генетического полиморфизма гена метилентетрагидрофолатредуктазы (МТНFR-С677Т) и дефицита фолиевой кислоты (ФК) в развитии гестоза и других акушерских осложнений (плацентарная недостаточность, ЗВУР и ВПР плода, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты) у первородящих женщин.

Материалы и методы: обследованы 129 первородящие женщины на сроках 27-38 нед.: из них, 60 беременных с разной степенью тяжести гестоза (25 - легкой, 20 - средней, 15 - тяжелой); 49 женщин без клиники гестоза, но из группы высокого риска: с ожирением – 10, гипертоническим синдромом – 14, пиелонефритом – 25; 20 – практически здоровых первородящих женщин.

У всех пациенток, кроме общеклинического обследования с оценкой гемостазиограммы (агрегация тромбоцитов: спонтанная и индуцированная; уровень фибриногена, АЧТВ, МНО, 12а зависимо фибринолиза, АТ III, РКМФ, ПДФ, плазминоген, определение протеина С и S), исследовали кровь методом ПЦР в реальном времени по детекции полиморфизма гена МТНFR-С677Т (метилентетрагидрофолатредуктазы), со всеми вариантами мутаций (гомозиготный вариант МТНFR-Т677Т, гетерозиготный вариант МТНFR-С677Т). Методом иммунохемилюминисцентного анализа (ИХА) определяли уровень фолиевой кислоты (ФК).

Результаты: В контрольной группе первородящих женщин выявлен нормальный вариант гена МТНFR-С677С, показатели гемостазиограммы в пределах нормы. Уровень ФК был снижен у 8 из 20 беременных.

У 21 женщины группы риска обнаружен нормальный вариант гена МТНFR-C677C, у 26- гетерозиготный вариант МТНFR-C677T, где аллель T, в сочетании с дополнительными, потенцирующими патологию факторами, увеличивает риск развития осложнений беременности. Все эти женщины имели незначительное снижение уровня ФК в крови. У двух беременных группы риска определили мутантный вариант МТНFR-T677T в сочетании с начальными признаками ДВС-синдрома и снижением уровня ФК в 2 раза. У одной из них выявлен малый порок развития плода (незаращение неба – «волчья пасть») и незначительное повышение в гемостазиограмме плазминогена и фибриногена.

У беременных с гестозом мутация гена МТНFR-C677T всегда сочеталась с резким снижением уровня ФК.

Из 25 женщин с гестозом легкой степени у 7 выявлен нормальный вариант гена, 13 беременных имели гетерозиготный вариант МТНFR-C677T, что клинически реализовалось в плацентарную недостаточность, ЗВУР плода I-II ст., у 5 женщин с мутантным вариантом МТНFR-T677T также наблюдали ЗВУР плода II ст., хр. внутриутробную гипоксию, маловодие. В гемостазиограмме всех женщин с легким гестозом было выявлено незначительное повышение D-димера, фибриногена, плазминогена, снижение АТ-III, т.е. начальные признаки ДВС-синдрома.

Среди беременных с гестозом средней степени: у 12 обнаружен мутантный вариант МТНFR-T677T, у 8- гетерозиготный вариант МТНFR-C677T, у 7 первородящих женщин с тяжелым гестозом выявлен гетерозиготный вариант МТНFR-C677T и у 8 - мутантный вариант МТНFR-T677T. У всех этих женщин диагностировали хронический ДВС-синдром, прогрессирование которого у 2 беременных с мутантным вариантом МТНFR-T677T привело к преждевременной отслойке нормально расположенной плаценты.

Таким образом, сочетание мутации гена МТНFR-T677T с дефицитом ФК у беременных всегда сопровождается хроническим ДВС-синдромом различной степени тяжести и гипертензией. Снижение уровня ФК при нормальном варианте гена МТНFR-C677C во время беременности не приводит к развитию гипертензивного синдрома, но реализуется большей частотой плацентарной недостаточности и ЗВУР плода.

Можно полагать, что определение содержания уровня ФК, а также маркеров внутрисосудистого свертывания и маркеров врожденных дефектов системы гемостаза (полиморфизм С677Т в гене МТНFR) является прогностически значимым в диагностике развития гестоза, преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты, плацентарной недостаточности, ЗВУР и ВПР плода.

РОЛЬ ЦИКЛИНА А1 В ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ И КЛЕТКАХ- ПРЕДШЕСТВЕННИКАХ

Р. Р. Мифтахова¹, А. Хедблом¹, А. Бредберг², Дж. Л. Перссон¹

¹ - Отделение экспериментального исследования рака,
Кафедра Лабораторной Медицины, Университет Лунда, Швеция,

² - Кафедра Медицинской Микробиологии,

Университет Лунда, Швеция

m-regi@mail.ru

Введение. Было обнаружено, что циклин А-типа, А1 избыточно экспрессируется у пациентов с гематопозитическими онкологическими заболеваниями. Позднее было показано также, что оверэкспрессия А1 в миелоидных клетках-предшественниках вызывает развитие миелоидной лейкемии у трансгенных мышей. Циклин А1 в норме экспрессируется у человека в CD34+ - гематопозитических стволовых клетках.

Целью данной работы было изучение роли циклина А1 в нормальном гематопозе с использованием мышинной линии с выключенным геном циклина (Ccpa^{-/-}).

Мы провели цитофлуориметрическую сортировку и детальный анализ различных популяций гематопозитических клеток, а также миелоидных и лимфоидных предшественников в костном мозге мышей. Выключение циклина А1 оказывало значительное влияние на клеточный цикл, число LSK и способность к миграции. Обработка потомков стволовых клеток УФ, стауроспорином, этопозидом и ФНО-альфа показала, что циклин А1 вовлечен в апоптоз и репарацию ДНК. Пересадка облученных стволовых

клеток необлученным и облученным сублетальными дозами реципиентам позволила продемонстрировать, что циклин А1 также участвует в хоуминге и лоджинге стволовых клеток.

Наши результаты показывают, что циклин А1 играет важную роль в регуляции гематопоеза, особенно в поддержании нормальной популяции гематопоетических стволовых клеток.

ГИПОМЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ У БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Р.Х. Мухаметшина¹, Ю.В. Филина^{1,2},
М.И. Арлеевская², А.Г. Габдулхакова²

¹ – ФГАУ ВПО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

² – ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия, Казань, Россия

riana.mukhametshina@gmail.com

В результате воздействия активных форм кислорода может происходить химическая модификация ДНК, которая ведёт к хромосомным абберациям и, как следствие, к изменению экспрессии генов на данном участке хромосомы. Практически любой воспалительный процесс, в том числе и аутоиммунные заболевания (АИЗ), сопровождается окислительным стрессом.

Метилирование геномной ДНК в целом и, в особенности, регуляторных участков генома - один из важнейших механизмов регуляции аппарата наследственности. Аномальное метилирование сопряжено с рядом серьезных патологических состояний: от врожденных пороков развития до онкологических и других заболеваний. О метилировании ДНК при аутоиммунных заболеваниях известно мало. Возможно, что именно паттерн метилирования или деметилирования определенных генов ответственен за нарушение функциональной активности иммунных клеток, и даже за наследование и развитие аутоиммунных заболеваний.

Предпосылками к исследованию явились следующие факты:

- родственники больных АИЗ имеют высокий риск развития аутоиммунных патологий;
- для больных аутоиммунными заболеваниями, а также кровных родственников больных ревматоидным артритом была выявлена повышенная оксидазная активность лейкоцитов периферической крови;
- отсутствие четких генетических маркеров/мутаций генов, ответственных за развитие ревматоидного артрита (РА) и системной склеродермии (ССД) предполагает наличие другого, возможно, эпигенетического механизма развития аутоиммунных заболеваний.

В связи с этим была поставлена цель: определить общий уровень метилирования геномной ДНК мононуклеарных клеток крови в группах больных ССД (n=12), РА (n=21) и их родственников (n=11) в сравнении со здоровыми донорами (n=7), не имеющими наследственной предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям.

Выделение геномной ДНК осуществляли по стандартной методике с помощью набора DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN), измеряли концентрацию ДНК в образцах и проводили реакцию рестрикции с помощью ферментов MspI и HpaII. Разделение фрагментов ДНК проводили в 1% агарозном геле.

Мы наблюдали некоторую деградацию ДНК в пробах без рестриктаз, как правило, она составляет 0.05-0.5 %. Под действием рестриктазы Msp I происходит практически полная рестрикция геномной ДНК - метил-нечувствительная рестриктаза расщепляет ДНК независимо от того, метилирован или не метилирован цитозин в сайте ее узнавания. Метил-чувствительная рестрикция под действием Hpa II вызывает деградацию ДНК, которая зависит от уровня общего метилирования цитозинов в сайте рестрикции.

Для оценки степени фрагментации ДНК мы применили денситометрический анализ с помощью программы TotalLab (v2.01). Статистическую обработку результатов проводили при помощи интервальных оценок с использованием 95% доверительного интервала для средней и t-критерия Стьюдента.

В норме у человека метилировано ~80% всех CpG динуклеотидов. В наших исследованиях у доноров процент метилиро-

вания составил $71 \pm 12,1\%$. Нами выявлено значительное снижение уровня общего метилирования ДНК для больных РА и ССД ($47,7 \pm 20,6\%$ и $48,2 \pm 22\%$, соответственно), причем для больных РА различия достоверны ($p \leq 0,05$). У родственников больных РА также имеется тенденция к снижению метилирования ДНК ($60,5 \pm 21,8\%$).

В случае для больных аутоиммунными заболеваниями данное снижение может быть объяснено тем, что происходит активация иммунных клеток – это сопровождается экспрессией новых белков, таких как провоспалительные цитокины ИЛ-2 и ФНО-альфа. Удивительно, что у родственников больных РА, у которых нет признаков заболевания, также наблюдается тенденция к снижению уровня общего метилирования ДНК.

Эпигенетические модификации генома используются в качестве потенциальных биомаркеров для диагностики и прогнозирования многих заболеваний. На основании наших данных мы пока не можем сказать, является ли снижение метилирования ДНК причиной развития аутоиммунного заболевания, или это является следствием окислительного стресса. Для выяснения этого необходимы дальнейшие исследования конкретных генов.

Таким образом, нами показано, что для больных аутоиммунными заболеваниями характерно гипометилирование геномной ДНК. У родственников больных РА, у которых нет признаков заболевания, также наблюдается тенденция к снижению уровня общего метилирования ДНК.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 09-04-97053

РОЛЬ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ В РАЗВИТИИ РЕСПИРАТОРНОГО ОТВЕТА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Тхи Нга Нгуен¹, Ю.В. Филина^{1,2},

М.И. Арлеевская², А.Г. Габдулхакова²

¹ – ФГАУ ВПО Казанский (Приволжский) Федеральный
Университет, Казань, Россия

² – ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская
Академия, Казань, Россия

Nn7189@gmail.com

Лейкоциты поглощают попавшие в организм бактерии и отмершие клетки и одновременно вырабатывают активные формы кислорода (АФК) для усиления деградации макромолекул. Выброс АФК обусловлен активацией NADPH-зависимой оксидазы. При аутоиммунных заболеваниях (АИЗ) наблюдается нарушение функциональной активности лейкоцитов. Избыточная продукция АФК повреждает не только бактериальные клетки, но и собственные ткани организма. Поэтому активность NADPH-оксидазы в клетке строго регулируется, значительную роль в этом процессе играют ионы Ca^{2+} и Ca^{2+} -зависимые сигнальные системы.

Целью работы было исследование роли экстраклеточного Ca^{2+} в развитии респираторного ответа лейкоцитов больных АИЗ, их родственников и здоровых доноров. Продукцию АФК оценивали методом люминол-зависимой хемилюминесценции. Мы сравнивали спонтанные уровни продукции АФК в суспензиях клеток и максимальные амплитуды ответов на стимуляцию.

Экспериментальные группы состояли из 18 пациенток с поздним ревматоидным артритом (РА) (продолжительность болезни более 3-х лет), 11 пациенток с ранним РА (продолжительность болезни менее 3-х лет), 10 родственниц РА I степени родства, 8 пациенток с системной склеродермией (ССД) и 6 здоровых женщин, не имеющих наследственной предрасположенности к АИЗ. Забор крови у родственниц производился только при отсутствии клинических признаков воспалений и инфекций.

В группе больных АИЗ и их родственников отмечалось повышение спонтанного уровня продукции АФК по сравнению со здоровыми донорами. Это может быть следствием праймирования

клеток в организме провоспалительными факторами или другими агентами. Наблюдалась также тенденция к повышению амплитуды ответа на fMLP у больных РА и их родственников, у больных ССД ответ на fMLP, наоборот, снижался.

Сигнальный путь активации NADPH-оксидазы при стимуляции fMLP идет через целый ряд ферментов, в том числе фосфолипазы С (PLC). PLC расщепляет липиды, катализирует расщепление PIP₃ до диацилглицерола (DAG) и инозитолтрифосфата (IP₃). DAG активирует семейство протеинкиназ С (PKC). Различают кальций-зависимые и кальций-независимые PKC. IP₃ участвует в высвобождении кальция из внутриклеточных депо, что также приводит к активации PKC. Кроме того, DAG и Ca²⁺ синергически усиливают перемещение PKC к мембране, тем самым облегчая сборку компонентов NADPH-оксидазы.

В регуляции выброса АФК лейкоцитами значительную роль играют ионы Ca²⁺. В наших экспериментах отсутствие Ca²⁺ в среде инкубации приводило к снижению спонтанной продукции АФК, особенно у родственников, больных с ранним РА и больных ССД. Возможно, за счет постоянной активации клеток происходит истощение запасов внутриклеточного Ca²⁺.

В бескальциевой среде отмечалось снижение продукции АФК в ответ на стимуляцию fMLP у больных ранним РА и больных ССД по сравнению с донорами. Известно, что в ответ на fMLP концентрация цитоплазматического кальция увеличивается. Это происходит за счет выхода кальция из кальций-запасующих депо и входа экстраклеточного кальция через плазматическую мембрану. Возможно, у больных происходит нарушение запасаения и транспорта кальция из внутриклеточных депо, и респираторный ответ лейкоцитов больных более зависим от входа экстраклеточного Ca²⁺ в клетку. Либо в изменении fMLP-вызванной оксидазной активности задействована Ca²⁺-зависимые протеинкиназы С.

Мы использовали синтетический аналог DAG - форболовый эфир (ФМА) - для прямой активации PKC. При стимуляции ФМА респираторный ответ был повышен у больных АИЗ и их родственников. Возможно это связано с нарушением функционирования Ca²⁺-зависимых PKC.

При стимуляции клеток форболовым эфиром респираторный ответ развивается без образования IP₃, вызывающего мобили-

зацию кальция из внутриклеточных депо. Таким образом, в бескальциевой среде ФМА-вызванный респираторный ответ реализуется преимущественно за счет Ca^{2+} -независимых РКС. Удаление внешнего Ca^{2+} при стимуляции лейкоцитов форболовым эфиром практически не влияло на продукцию АФК. То есть, усиление респираторного ответа лейкоцитов больных и их родственников может происходить за счет дополнительной активации Ca^{2+} -зависимых РКС.

Таким образом, для полноценного респираторного ответа лейкоцитов необходим приток экстраклеточного Ca^{2+} . У больных АИЗ и их родственников респираторный ответ повышен и более зависим от внешнего кальция, что может быть следствием нарушения функционирования Ca^{2+} -зависимых РКС.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 09-04-97053.

ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К НАТИВНОЙ ДНК НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

А.З. Сабирзянова, Т.А. Невзорова
ФГАУ ВПО Казанский (Приволжский) Государственный
Университет, Казань, Россия
111v_alsusa@inbox.ru

Системная красная волчанка (СКВ) и ревматоидный артрит – тяжелые аутоиммунные заболевания, характеризующиеся широким спектром клинических и серологических проявлений. Часто данные заболевания возникают у людей уже в юношеском возрасте, приводя к инвалидности. К сожалению, с каждым годом число больных аутоиммунными патологиями возрастает.

Уровень антител (АТ) к нативной ДНК (нДНК) является важным показателем течения аутоиммунного процесса, особенно при СКВ. Но работы последних лет показывают, что не только и не столько уровень, а в большей мере свойства АТ определяют течение патологического процесса.

Целью работы явилось исследование влияния АТ класса IgG к нДНК на иммунокомпетентные клетки крови человека *in vitro*.

Оценка изменения метаболизма, пролиферации и жизнеспособности клеток под воздействием АТ к нДНК показала, что АТ здорового донора и больного СКВ на стадии обострения заболевания проявляют сходное воздействие на клетки – подавляют пролиферацию, снижают потребление глюкозы и содержание белка, приводят к существенной гибели клеток. СКВ-АТ к ДНК, обладающие ДНК-гидролизующей активностью, оказывают более выраженный цитотоксический и генотоксический эффект.

В данном случае большее значение имеет заряд АТ, нежели их аффинность к антигену. Положительно заряженные АТ к нДНК донора и больного СКВ на стадии обострения заболевания проявляют большую цитотоксичность по сравнению с отрицательно заряженными IgG-АТ из тех же сывороток.

Действие АТ к нДНК больного СКВ в период ремиссии заболевания не отличается от контроля.

Показано, что при ревматоидном артрите ведущая патологическая роль, вероятно, принадлежит высокоаффинным АТ к нДНК, не зависимо от заряда. Кроме того, воздействие на клетки АТ здоровых родственников иллюстрирует потенциальную патогенность высокоаффинных АТ к нДНК родственников, не смотря на отсутствии у них клинических проявлений ревматоидного артрита.

В докладе обсуждается биологическая роль АТ класса IgG к нДНК в норме и при патологии СКВ и ревматоидного артрита.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТА И ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ В ЛЕЧЕНИИ АДЪЮВАНТНОГО АРТРИТА КРЫС

Сабирова А.Я., Залялютдинова Л.Н.,
Насыбуллина Д.А., Петрова А.А.

ГОУ ВПО Казанский Государственный Медицинский
Университет, Казань, Россия
sabirovy@yahoo.com

Введение. Альфа-липоевая кислота (ЛК) является уникальным антиоксидантом, растворимым как в водной, так и в липид-

ной среде, что позволяет ей как циркулировать в плазме крови, так и проникать через клеточные мембраны. ЛК является объектом изучения исследователей по всему миру. Целью нашего исследования явилось изучение противовоспалительных свойств различных доз ЛК при пероральном применении в сравнении с диклофенаком натрия (ДФ) на модели адьювантного артрита (АА).

Выбор данной модели обусловлен тем, что субплантарное введение крысам полного адьюванта Фрейнда вызывает в контралатеральной лапе артрит, схожий с ревматоидным артритом (РА) человека по основным параметрам: характеру синовита, синовиальной гиперплазии, неоангиогенеза, инфильтрации синовиальной оболочки воспалительными клетками, образованию паннуса и эрозий суставного хряща и кости. Более того, АА крыс соответствует РА человека по профилю заинтересованных в процессе цитокинов и биологических факторов, присутствующих в синовиальной оболочке и хряще.

Материалы и методы. В эксперименте использовали 65 белых нелинейных крыс обоего пола массой 220 ± 20 г. АА моделировали субплантарным введением в правую лапу контрольных и опытных крыс 0,1 мл полного адьюванта Фрейнда. Исследуемые препараты (ЛК в дозах, соответствующих 1/10, 1/100 и 1/200 DL50, и ДФ в средней эффективной дозе) вводили внутривентрально с помощью зонда с 12-го дня в течение 14 дней. Результаты исследований оценивали в динамике онкометрически, с помощью метода инфракрасной термографии, данных общего анализа крови. Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Критерием достоверности различий явилось значение $p < 0,05$.

Результаты. Первичная воспалительная реакция формировалась на третий день (средний прирост объема правой лапы составил $66 \pm 5\%$). К 25 дню средний прирост объема правой лапы в контрольной группе и группе, получающей основу, составил $76 \pm 5\%$. Применение ЛК в дозе, соответствующей 1/10 и 1/200 DL50, практически устраняло первичную воспалительную реакцию, вызванную введением адьюванта. Применение дозы, соответствующей 1/100 DL50, было менее эффективно, но тем не менее достоверно превосходило эффективность ДФ в средней эффективной дозе.

Вторичная иммунологическая реакция начала формироваться на 6 день (средний прирост объема левой лапы составил $17 \pm 2\%$). К 25 дню средний прирост объема левой лапы достиг $42 \pm 5\%$ у контрольной группы и группы крыс, получавших основу. Применение ЛК в дозе, соответствующей 1/10 и 1/200 DL50, практически устраняло вторичную иммунологическую реакцию, вызванную введением адьюванта. Применение дозы, соответствующей 1/100 DL50 было менее эффективно, но, тем не менее, достоверно превосходило эффективность ДФ в средней эффективной дозе.

Применение ЛК приводило к нормализации термограммы, что говорит о снижении активности аутоиммунного воспалительного процесса. В ОАК после лечения ЛК нормализовывалось количество лейкоцитов, снижалась скорость оседания эритроцитов. В ответ на введение адьюванта в лейкоформуле развивался моноцитоз, который устранился после лечения ЛК. Применение диклофенака натрия было менее эффективно.

Вывод. Таким образом, нами было впервые показано, что пероральное применение ЛК на модели АА при пероральном применении эффективно уменьшает выраженность как первичной воспалительной, так и вторичной иммунологической реакции и по эффективности превосходит препарат сравнения.

Обсуждение. Потенциальная эффективность ЛК в лечении АА может быть обусловлена целым рядом факторов.

Известно, что в основе патогенеза любого воспаления лежит свободно-радикальное окисление. ЛК, являясь антиоксидантом, является «ловушкой» свободных кислородных и азотных радикалов и блокирует этот механизм.

В настоящее время большое внимание уделяется роли цитокинов в патогенезе РА. Наиболее значимым провоспалительным цитокином является фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), который индуцирует образование провоспалительных цитокинов (ФНО- β , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-17) в гиперплазированных синовиальных фибробластах, лимфоцитах и макрофагах. Он также стимулирует экспрессию рецепторов для ангиопоэтина-1, увеличивает количество остеокластов. В настоящее время на ряде моделей *in vitro* показано, что ЛК блокирует продукцию ФНО- β . Аналогичной способностью блокировать провоспалительные цитокины обладает группа наиболее динамично развивающихся препаратов

для лечения ревматоидного артрита – биологические агенты.

Разрушение суставных тканей происходит под действием матриксных металлопротеиназ (ММП), выработка которых стимулируется лигандом рецепторного активатора ядерного фактора κ B (RANKL). Он синтезируется синовиальными фибробластами, Т-лимфоцитами, макрофагами и остеобластами под влиянием ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-17 и ФНО- β . Известно, что АЛК напрямую ингибирует RANKL и выработку ММП.

Также в патогенезе РА играет роль активация системы комплемента, которая отвечает за воспаление и тканевую деструкцию. ЛК блокирует активацию комплемента, будь то NO-, липополисахарид-индуцированная активация или активация, вызванная метаболитами арахидоновой кислоты.

В связи с этим перспективным является изучение механизмов эффективности ЛК в качестве патогенетического средства для лечения РА.

НЕЙРО-ИММУННЫЙ КОМПОНЕНТ ВОСПАЛЕНИЯ: ФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛА ПОД КОНТРОЛЕМ НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ АЦЕТИЛХОЛИНА

В.Г. Сафронова¹, Е.А. Вульфius¹, Е.В. Крюкова², В.И. Цетлин²

¹ - ГУ Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

² - Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

safronova@icb.psn.ru

В текущем десятилетии была сформирована концепция холинэргической регуляции воспаления через так называемый «ацетилхолиновый противовоспалительный путь». Активация физиологического пути, включающего блуждающий нерв, продуцирующий ацетилхолин (АХ), и гомомерные альфа7 никотиновые рецепторы ацетилхолина (нХР), присутствующие на тканевых макрофагах, ослабляет продукцию провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1, IL-6 и IL-18) и подавляет воспалительный процесс. Никотин и другие экзогенные специфические агонисты нХР действуют подобным образом, что позволяет рассматривать альфа7 нХР в качестве фармакологической мишени при воспале-

ниях разной этиологии. Подтипы нХР охарактеризованы в Т и В лимфоцитах, моноцитах, макрофагах и дендритных клетках. Нейтрофилы, основная функция которых состоит в обеспечении наиболее быстрых и мощных реакций в воспалительном процессе, также оснащены нХР. Так, на нейтрофилах человека обнаружены подтипы альфа7, альфа4бета2 и альфа3бета4 нХР. Функции нХР разных подтипов в нейтрофилах остаются не определенными.

Целью нашего исследования является определение подтипов нХР в нейтрофилах мыши и выявление их роли в регуляции функций этих клеток. Были использованы агонисты нХР (АХ, никотин, эпibatидин) и селективные антагонисты подтипов нХР: альфа-кобратоксин (альфаСТХ) - альфа7 и нХР мышечного типа; мутантный токсин [A10L]PnIA - альфа7 и альфа3бета2; МП - альфа3бета2 и альфаб-содержащие гетеромерные нХР. Исследование проведено на нейтрофилах, изолированных из очага острого воспаления в перитонеальной полости мышей линий NMRI, C57BL/6 и Balb/c.

Основные результаты работы: 1) АХ и никотин модифицировали активированную пептидом N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) и форболовым эфиром генерацию активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами из очага острого воспаления концентрационно- и время-зависимым образом, тогда как эпibatидин, агонист альфа4бета2 подтипа нАХР, не оказывал влияния ни на базовый уровень продукции АФК, ни на респираторный взрыв, инициированный fMLF; 2) АХ и никотин усиливали неспецифическую адгезию клеток в зависимости от времени действия и дозы; 3) наблюдалась зависимость действия агонистов от пола животного, действие было наиболее выражено у самцов; 4) альфаСТХ, МП и [A10L]PnIA блокировали действие никотина и АХ. Полученные результаты дают основание считать, что нейтрофилы мыши экспрессируют альфа7 и альфа3бета2 подтипы нХР, которые участвуют в регуляции адгезии и генерации АФК нейтрофилами из очага острого воспаления.

Исследование поддержано грантами РФФИ № 07-04-01004 и №10-04-00737.

ДИСБАЛАНС ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И ИХ РОДСТВЕННИКОВ

О.М. Семенова¹, А.Е. Хорошева²

¹ - ГАУЗ РКБ №3, Казань, Россия

² – ФГАУ ВПО Казанский (Приволжский) Федеральный
Университет, Казань, Россия
semenova.olga.m@gmail.com

Ревматоидный артрит (РА) – поражение суставов, одним из основных механизмов которого является хронический воспалительный процесс.

В течении ревматоидного артрита различают 2 этапа. Ранний ревматоидный артрит – этап постепенного включения в патогенез отдельных механизмов заболевания и развертывание типичных клинических симптомов. Формально это поражение суставов длительностью не более 6 месяцев. Однако, объективно продолжительность раннего артрита индивидуальна (иногда до 2-3 лет). Продвинутый ревматоидный артрит – заболевание со всеми типичными его проявлениями (разрушение суставов, появление диагностических маркеров РА, явного хронического воспалительного процесса).

Близкие кровные родственники больных ревматоидным артритом предрасположены к развитию аутоиммунных патологий, задолго до начала болезни у них выявляются стертые клинические признаки нарушенного функционирования иммунной системы, в частности, склонность к частым и продолжительным банальным инфекциям (Арлеевская М.И. и соавт., 2005)

Целью работы было выявление клинических признаков окислительного стресса у больных ревматоидным артритом и их кровных родственниц по сравнению с контрольной группой здоровых женщин, чья наследственность не отягощена аутоиммунными заболеваниями.

Для лейкоцитов больных ранним ревматоидным артритом была выявлена избыточная спонтанная и стимулированная зимозаном (ОЗ) продукция радикалов кислорода. При стимуляции ОЗ лейкоцитов родственников продукция активных форм кислорода по сравнению с контролем также была повышена.

Избыточная спонтанная продукция радикалов кислорода клетками больных РА может свидетельствовать о постоянной стимуляции лейкоцитов провоспалительными стимулами в условиях хронического аутоиммунного воспаления. Повышение уровня продукции АФК у больных ранним РА и родственников при стимуляции ОЗ обусловлено, по-видимому, праймингом лейкоцитов во время частых и продолжительных инфекционных эпизодов.

У больных с продолжительностью РА более 3 лет уровень стимулированной продукции АФК близок к контрольному, что при наличии характерного для РА избыточного уровня праймирующих стимулов, видимо, свидетельствует об истощении ресурсов лейкоцитов.

Как известно, АФК взаимодействуют в основном с компонентами антиоксидантной защиты, а также с липидами и белками, которые затем утилизируются мононуклеарными фагоцитами и удаляются из сосудистого русла. Исследования цельной крови больных РА и их родственников не выявили достоверные различия в спонтанном и стимулированном уровне продукции АФК по сравнению с контрольной группой. Тем не менее, мы наблюдали повышенный уровень окисленных продуктов в группах больных и родственников, несмотря на отсутствие клинических и лабораторных признаков воспалительного процесса в момент взятия крови.

Мы предполагаем, что у больных РА и их близких родственников нарушено функционирование мононуклеарных фагоцитов, что приводит к нарушению выведения окисленных продуктов и постепенному их накоплению. Высокий уровень маркеров оксидативного стресса и повышенная интенсивность образования АФК у родственников и больных ранним ревматоидным артритом, видимо, обусловлена частыми и продолжительными инфекциями.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАЗВИТИЮ АТЕРОСКЛЕРОЗА ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

И.Л.Сердюк¹, Нго Тхи Бинь Минь²

¹ – ГАУЗ РКБ №3, Казань, Россия

² – ФГАУ ВПО Казанский (Приволжский)

Федеральный Университет, Казань, Россия

dr.serdyuc@mail.ru

К числу актуальных и сложных проблем медицины относят системные болезни соединительной ткани, среди которых важное место по частоте и распространенности занимает системная склеродермия (ССД). Системная склеродермия - аутоиммунное заболевание, вызывающее склеротическое поражение кожи и внутренних органов.

В развитии заболевания, в частности, играет роль хроническое воспаление. При воспалении происходит активная инфильтрация тканей циркулирующими в крови моноцитами и нейтрофилами. Эти клетки продуцируют активные формы кислорода, излишки которых нейтрализуются системой антиоксидантной защиты. При нарушении в организме баланса между прооксидантами и компонентами антиоксидантной защиты развивается окислительный стресс. Излишки кислородных радикалов вызывают окислительную модификацию и повреждение белковых и липидных молекул, ДНК, что в свою очередь усиливает воспаление.

В последние годы активно изучается проблема взаимосвязи аутоиммунных заболеваний и атеросклероза. В развитии атеросклероза важную роль играют проатерогенные факторы: хроническое воспаление, гипертриглицеридемия, высокое содержание окисленных ЛП в том числе ЛПНП и изменение соотношения ЛПНП и ЛПВП. Антиатерогенным действием обладают ЛПВП и антиоксидантная система.

Целью работы был поиск лабораторных признаков предрасположенности к развитию атеросклероза у больных системной склеродермией

При исследовании продукции АФК во взвесах лейкоцитов мы не получили достоверных различий в группах, однако, следу-

ет отметить, что у больных ССД отмечается повышение как спонтанного уровня продукции АФК, так и амплитуды ответа на опсонизированный зимозан (ОЗ) - в 2,24 раза по сравнению с здоровыми донорами. Возможно, отсутствие выраженного повышения оксидазной активности обусловлено минимальной активностью хронического воспаления при склеродермии.

Параллельная регистрация оксидазной активности в цельной крови представляет интерес для оценки интегральной функции антиоксидантных систем. Уровни спонтанной и ОЗ-индуцированной хемилюминисценции в цельной крови у больных ССД были достоверно повышены. Таким образом, можно предположить, что функции антиоксидантных систем при ССД, вероятно, недостаточны, поскольку не справляются даже с минимальным повышением оксидазной активности.

Как известно, перекисное окисление липидов и окислительная модификация белков провоцируется радикалами кислорода. Содержание окисленных продуктов в крови зависит от соотношения интенсивности их образования и выведения мононуклеарными фагоцитами. Мы обнаружили достоверное повышение содержания окисленных белков, а также сывороточных продуктов перекисного окисления липидов у больных ССД по сравнению со здоровыми донорами, что, в свою очередь, провоцирует развитие аутоиммунных реакций (высоко иммуногенные окисленные белки) и атеросклероза (окисленные липиды).

Мы обнаружили изменения в составе сывороточных липидов, которые также считаются проатерогенными факторами. Уровень ТГ у больных в 2,3 раза превышал контрольный показатель. Однако, эти различия были недостоверными. Уровни ОХ, ХС в составе ЛПНП у больных достоверно превышали показатели здоровых лиц. Уровень ХС ЛПВП у больных был достоверно снижен. Полученные данные позволяют предположить, что при системной склеродермии возможно нарушение функций ЛПВП, которые обладают антиатерогенными свойствами.

Колебания содержания ХС липопротеидов ВП и НП при системной склеродермии являются проатерогенными. Это подтверждается достоверным увеличением индекса атерогенности в опытной группе – в 3 раза.

При разделении больных ССД на 2 группы по индексу атерогенности (ИА более 3 и менее или равно 3) уровень содержания продуктов перекисного окисления липидов у больных с ИА более 3 достоверно превышал контрольный показатель и показатель у больных с ИА менее 3. Возможно, выраженность проатерогенных сдвигов в структуре липидов при склеродермии зависит от степени выраженности аутоиммунного воспаления, интегральным клинико-лабораторным показателем которого служит активность заболевания.

Таким образом, при системной склеродермии, выявлены проатерогенные колебания концентраций ОХ в сывороточных липопротеидах.

РОЛЬ МАЛЫХ G-БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА RHO В РЕГУЛЯЦИИ РЕСПИРАТОРНОГО ОТВЕТА НЕЙТРОФИЛОВ

Ю.В. Филина^{1,2}, А.Г. Габдулхакова²,
В.Г. Сафронова³, М.А. Нюхнин²

¹ – ФГАУ ВПО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

² – ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия, Казань, Россия

³ – ГУ Институт Биофизики Клетки РАН, Пущино, Россия
julia.v.filina@gmail.com

Важной группой хемоаттрактантов являются N-формилированные пептиды – продукты жизнедеятельности и деградациии бактерий и митохондрий, которые активируют хемотаксис, секреторную дегрануляцию и респираторный взрыв. Рецепторы с высоким и низким сродством к fMLF могут использовать разные ансамбли компонентов сигнальных путей. Об этом свидетельствуют следующие экспериментальные факты: праймирование инсулином fMLF-вызванного респираторного взрыва нейтрофилов мыши происходит только при активации клеток высокими дозами формилированного пептида (Safronova, Gabdoulkhakova, 2009). Кроме того, специфические ингибиторы MEK и p38MAPK вызывают значительное подавление ответа на

1 мкМ, но не 50 мкМ fMLF. Продукция АФК и грануляция при активации низкоаффинных рецепторов селективно блокируется PIP_2 -связывающим пептидом RBP10, но не влияет на увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле (Fu et al., 2004). Однако до сих пор четко не определены сигнальные системы, вовлеченные в рецептор-зависимую генерацию АФК при активации высоко- и/или низко-аффинных рецепторов fMLF.

Множество клеточных процессов, включая работу фагоцитарной NADPH-оксидазы, фагоцитоз, эндоцитоз, поляризацию эпителиальных клеток и морфогенез, регулируется малыми ГТФазами (Schwartz, 2004). Мы предположили, что малые G-белки могут быть одной из вероятных точек передачи и дивергенции сигнала рецепторов fMLF, и целью исследования было выяснение роли малых G-белков семейства Rho в сигнализации высоко- и низкоаффинных рецепторов. Работа была проведена на вызванных перитонеальных нейтрофилах мышей линии Balb/c с использованием методов флуоресцентной микроскопии, хемилюминесценции и вестерн-блота. Активацию малых G-белков проводили при помощи специфических активаторов Rho (CN01, Cytoskeleton) и Rac/Cdc42 (CN02, Cytoskeleton).

При стимуляции рецепторов fMLF в нейтрофилах происходит транслокация Rho-ГТФаз к примембранной области, что свидетельствует об их активации (Michaelson et al., 2001). Наиболее выраженные эффекты наблюдаются для Rho при стимуляции низкоаффинных рецепторов и для Rac при стимуляции высокоаффинных рецепторов fMLF.

Активация Rho приводит к образованию стресс-фибрилл и увеличению адгезии (Ren et al., 1999; Schwartz, 2004). Rho-активатор в наших экспериментах снижал респираторный ответ при стимуляции высокоаффинных fMLF-рецепторов и не влиял на ответ при стимуляции низкоаффинных рецепторов. Возможно, модуляция активности NADPH-оксидазы связана с реципрокными отношениями между хемотаксисом и респираторным ответом: при движении нейтрофилов по градиенту хемотаксического агента происходит подавление продукции АФК.

Активатор Rac/Cdc42 также вызывал снижение ответа на fMLF в низкой концентрации и не влиял на ответ при стимуляции низкоаффинных рецепторов. Rac и Cdc42 являются медиаторами

сигналов с поверхностных рецепторов, Rac2 в фагоцитах также непосредственно участвуют в продукции АФК как компонент НАДФН-оксидазной системы, Rac и Cdc42 также могут регулировать цитоскелет, преимущественно при взаимодействии с Rho.

Изменение продукции АФК происходит при активации и Rho, и Rac/Cdc42 белков. Известно, что активность Rac1 и RhoA может быть антагонистичной, а Cdc42, наоборот может активировать и Rac, и Rho (Nobes&Hall, 1995; Rottner et al., 1999). Таким образом, подавление продукции АФК может быть вызвано совместной активацией Cdc42 и Rho, но не Rac и Rho, или происходить совершенно независимо.

Одним из ключевых компонентов внутриклеточной передачи сигнала с поверхностных рецепторов являются каскады митоген-активируемых протеинкиназ. Известно, что p38MAPK может фосфорилировать цитоплазматические субъединицы NOX (Ammendola et al., 2004). Показано, что ингибирование p38MAPK снижает уровень респираторного ответа нейтрофилов при стимуляции высокоаффинных рецепторов fMLP (Safronova&Gabdoulkhakova, 2009).

В наших экспериментах уровень p-p38MAPK повышался при стимуляции как высокоаффинных, так и низкоаффинных рецепторов fMLF. Активация малых G-белков по-разному влияла на фосфорилирование p38MAPK. Rho-активатор снижал уровень фосфорилированной MAPK ниже уровня pp38 в интактных клетках, что может происходить вследствие активации фосфатаз и запуска дефосфорилирования. Rho-ГТФаза, во видимому, не принимает участия в передаче сигнала от FPRs к p38MAPK, так как активатор Rho и fMLF действуют разнонаправленно и изменение уровня p-p38 MAPK представляет собой сумму эффектов Rho-активатора и fMLF.

Активация Rac/Cdc42, в отличие от Rho, повышает уровень фосфорилированной p38MAPK. При сигнализации с низкоаффинных рецепторов fMLP активация Rac/Cdc42 способствует фосфорилированию p38MAPK, и в то же время при сигнализации с высокоаффинных рецепторов препятствуют активации p38MAPK. То есть, регуляция респираторного ответа при стимуляции рецепторов fMLF может происходить за счет регуляции фосфорилирования p38MAPK при участии Rac/Cdc42.

Таким образом, малые ГТФазы семейства Rho участвуют в сигнализации рецепторов fMLF и могут регулировать респираторный взрыв нейтрофилов. Активация белков Rho и Rac/Cdc42 подавляет продукцию АФК при стимуляции высокоаффинных рецепторов fMLF и не влияет на продукцию АФК при стимуляции низкоаффинных рецепторов. Регуляция респираторного ответа белками Rac/Cdc42 при стимуляции рецепторов fMLF может происходить за счет регуляции фосфорилирования p38MAPK.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 09-04-97053.

ОЦЕНКА УРОВНЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ НА РАННЕЙ И ПОЗДНЕЙ СТАДИЯХ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ИХ ЗДОРОВЫХ РОДСТВЕННИКОВ

А.А. Хабибуллина¹, М.И. Арлеевская², Т.А. Невзорова¹

¹ – ФГАУ ВПО Казанский (Приволжский) Государственный Университет, Казань, Россия

² – ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия, Казань, Россия

TNevzorova@mail.ru

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое воспалительное заболевание соединительной ткани суставов, с вовлечением в патологический процесс других тканей и органов.

В развитии РА могут участвовать активные формы кислорода. Изменение уровня АФК и развитие окислительного стресса может являться одним из показателей развития РА, а также свидетельствующим об инициации патологических процессов у родственников больных, которые, возможно, имеют генетическую предрасположенность к РА.

Обнаружено, что изменения, протекающие при патологических процессах у больных РА сопровождаются изменением показателей окислительного стресса в зависимости от истории заболевания.

У родственников и больных РА на поздней стадии заболевания в сыворотке крови повышено ($\alpha=0,05$) содержание гидро-

перекисей липидов и составляет 0,04 о.е./мл и 0,04 о.е./мл соответственно.

У родственников повышена активность супероксиддисмутазы эритроцитов и составляет 38 % ингибирования адреналина. У близких родственников больных РА повышена активность каталазы (0,011 мкмоль/мин: 0,0008; 0,075).

Достоверных различий в содержании витаминов А и Е в сыворотке крови между группами не обнаружено. У родственников больных РА повышено содержание каротиноидов в сыворотке крови и составляет 3,7 мг/мл (1,25; 6,0).

У родственников содержание оксида азот повышено и составляет 0,024 о.е. нитрит-иона (0,008;0,041). У больных РА с длительной историей заболевания понижено содержание оксида азота (0,016 о.е. нитрит-иона: 0,011; 0,047).

У родственников повышено содержание церулоплазмينا в сыворотке крови и составляет 13,125 мг/мл (3,675;22,575).

В докладе обсуждаются возможные причины развития РА.

ОСОБЕННОСТИ ДНК РОДСТВЕННИКОВ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Р.Р. Шамсиева¹, М.И. Арлеевская², Т.А. Невзорова¹

¹ – ФГАУ ВПО Казанский (Приволжский) Государственный Университет, Казань, Россия

² – ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия, Казань, Россия

TNevzorova@mail.ru

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое воспалительное заболевание соединительной ткани суставов, с вовлечением в патологический процесс других тканей и органов.

Одним из характерных признаков РА и, возможно, одной из причин развития является повышенное содержание в крови больных аутоантител (ААТ) к ДНК, которые, взаимодействуя с клетками организма, вызывают их функциональные нарушения. Вероятно, изменения в строении ДНК клеток организма и её экспонирование иммунной системе может инициировать образова-

ние патологических ААТ к ДНК.

Для поиска конформационных изменений в структуре ДНК в нуклеоидном виде лейкоцитов здоровых доноров, больных РА и их клинически здоровых родственников исследовали флуоресценцию комплексов этидий бромид (ЭБ)-ДНК и ДАФИ-ДНК. У родственников больных РА она достоверно повышена.

В дальнейшем для исследований структуры ДНК провели фенольную экстракцию ДНК из мононуклеаров здоровых доноров, больных РА и их здоровых родственников и оценили степень гомогенности. ДНК мононуклеаров больных РА и родственников отличается по электрофоретической подвижности от ДНК здоровых доноров и больных РА. Спектры поглощения ЭБ при взаимодействии с ДНК больных РА и здоровых доноров подобны и отличаются от спектра поглощения ЭБ с ДНК родственников больных РА. ДНК родственников больных РА, вероятно, по структурным особенностям занимает промежуточное положение между нормальной ДНК и ДНК организма, в котором происходит аутоиммунная патология.

В докладе обсуждаются возможные причины развития РА.

ENGLISH

**TNF- α AND ITS RECEPTORS GENES POLYMORPHISMS AS
A FACTOR OF THE GENETIC DISORDERS OF
PROGRAMMED CELL DEATH IN AUTOIMMUNE
THYROIDITIS**

E.M. Biktagirova¹, E.N. Chukhlovina¹, L.I. Sattarova²,
G.R. Vagapova³, Z.I. Abramova¹, O.A. Kravtsova¹

¹ - Department of Biochemistry, Kazan (Volga) Federal University,
Kazan, Russia

² - Interregional clinical diagnostic center, Kazan, Russia

³ - Kazan State Medical Academy, the department of endocrinology,
Kazan, Russia

elnarabik@gmail.com

Introduction. The problem of autoimmune thyroiditis (AITD, Hashimoto's thyroiditis) to date is important as the etiology, pathogenesis and diagnosis have not yet received its final decision. To date, proved the role of apoptosis in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases, including Hashimoto's thyroiditis. It is shown that autoantibodies (AAb) to DNA are potent regulators of apoptosis, the rate at which the AITD repeatedly increases. Along with this most well-studied sequence of events leading to cell apoptosis as a result of interactions between proteins from the family of tumor necrosis factor (TNF) with specific receptors. According to studies in recent years, the central pathogenetic part in the development of autoimmune endocrine disease is a partial defect of immune surveillance that occurs against the backdrop of existing genetic predisposition (such as genes of HLA, TNF- α and its receptors, etc.) under the influence of environmental factors.

The aim was to study the level of antibodies to native (n) and denatured (d) DNA, DNA-hydrolyzing activity in the serum of healthy and sick, as one of the factors of apoptosis in violation of AITD, as well as its genetic component, i.e Association analysis of polymorphisms -308A/G of TNF- α , I/D 15 bp and +196 T/G of TNFR2; -609G/T and -1135C/T of TNFR1.

Materials and Methods: The levels of antibodies to DNA in serum (patients – 137, women without pathology of the thyroid - 161)

were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), DNA-hydrolyzing activity of anti-DNA antibodies - to convert super-coiled plasmid pBR322 in the ring and linear form by electrophoresis. Genotyping of polymorphic loci was carried out taking into account the activity of the autoimmune process, which assessed the level of antibodies to thyroid peroxidase (Ab TPO). DNA samples were obtained from whole blood by phenol-chloroform extraction. Analysis of gene polymorphisms was performed by PCR using allele specific primers. Statistical data processing was performed using UNPHASED 3.1.5, the estimate of association of polymorphisms of genes by calculating the relative odds ratio (OR).

Results: In serum of patients with Hashimoto's thyroiditis present antibodies to both native and to denatured DNA, and substrate specificity of DNA-abzymes aimed at single-stranded DNA, as evidenced by significant increase in the content of Ab to dDNA (*Me* of the control group - 0.79 (95% CI 0.34 - 0.23) *Me* of patients with Hashimoto's thyroiditis - 0,94 (95% CI 0.41 - 0.34)) compared with the control group. Shows a direct correlation between the content of antibodies to TG and Ab to dDNA ($R_s = 0,381$ and 0.3 , $p = 0.01$ (respectively)), as well as the reverse - between the level of Ab to TPO and AB to dDNA ($R_s = 0,34$ and $0,44$, $p = 0.01$ (respectively)). Allele G ($P = 8.17 \cdot 10^{-8}$, OR = 3.18; CI 2,0-4,9), genotypes GG ($P = 0.0006$, OR = 10.85; CI 3,41-34,4) and AG ($P = 0.005$, OR = 3.52; CI 1,92-6,4) for polymorphic locus -308A/G gene TNF- α , are markers of genetic susceptibility to Hashimoto's thyroiditis, and the heterozygous genotype was associated with a moderate output of Ab to TPO ($P = 0.018$, OR = 2.89; CI 1,4-5,8), the genotype GG - Ab to TG ($P = 0.05$, OR = 3.16; CI 1,2-8,31). Allele ($P = 8.17 \cdot 10^{-8}$, OR 0.3; CI 0,2-0,48) and AA genotype ($P = 5.2 \cdot 10^{-7}$, OR = 0.09; CI 0.02 -0.29) have a protective effect, reducing the production of these antibodies ($P = 0.001$, OR = 0.5; CI 0,35-0,88; and $P = 0.0008$, OR = 0.27; CI 0,1-0,7 (respectively)).

Genotypes CC ($P = 1.04 \cdot 10^{-8}$, OR = 5.04, CI 2,5-9,9) and DD ($P = 0.01$, OR = 1.41; CI 0,59-3,36) polymorphisms -1135 T/C, del 15bp of TNFR1 and 2 genes (respectively) are associated with susceptibility to autoimmune thyroiditis in women of RT, the frequency of occurrence of the homozygous genotype CC was significantly increased in patients with elevated levels of Ab to TG ($P = 0.002$, OR =

4, 08; CI 1,6-10,4) and TPO (P = 0.0002, OR = 2.35; CI 1,14-4,7) and I / I - Ab to TPO (P = 0.03 , OR = 1.03; CI 0,2-3,8). While the T allele (P = $4.85 \cdot 10^{-9}$, OR 0.35; CI 0,24-0,5) and heterozygous genotypes I/D (P = $4.95 \cdot 10^{-5}$, OR = 0.35 ; CI 0,19-0,65), C/T (P = 0.001, OR = 0.25; CI 0,14-0,44) and homozygous TT (P = 0.002, OR = 0.19; CI 0.1 -0.39) of these same polymorphisms have a protective action, with low levels of Ab to TG and TPO.

Polymorphic loci -609G/T and +196 T/G of TNFR1 and TNFR2 genes (respectively) are not associated with Hashimoto's thyroiditis in this sample.

Conclusions: The findings of the study level and the properties of antibodies to DNA at AITD have practical value in the development of modern methods of immunodiagnosis and immunotherapy. The results of genotyping may provide a basis for determining risk factors for this disease.

COMPARATIVE EFFICACY OF DRUGS WITH IMMUNOMODULATING ACTIVITY XYMEDON AND DIMEPHOSPHON IN CHRONIC RHEUMATIC HEART DISEASE

R.M. Gazizov, E.A. Aczel, N.I. Beilina, L.R. Gazizova
Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia
rugazizov@yandex.ru

Effectiveness of medicines that have immunocorrective action in the treatment of patients with chronic rheumatic heart disease (RHD) is noted by many researchers. The aim is a comparative evaluation of the effectiveness of domestic original drugs with immunomodulating activity Xymedon and dimephosphon at RHD.

290 patients with RHD in age from 20 to 69 years were observed, among them women – 223, men - 67. Patients were divided into three groups: 74 patients in group I received within three weeks of traditional therapy (TT), 109 patients of group II on the background of the TT to receive daily Xymedon in tablets of 0.5 g 3 times a day for three weeks, 107 patients group III against TT dimephosphone received within 21 days inside of 10-15 ml of 15% solution 3 times a

day. To evaluate the effectiveness of treatment weekly in the dynamics determined the number of CD3 + - T-lymphocytes and their subpopulations of CD4 + - and CD8 + - T-lymphocytes and their relation to the method of indirect immunofluorescence analysis using monoclonal antibodies, the functional activity of lymphocytes in the test RBTL to PHA and in the test of ConA-induced suppression; bactericidal and cytotoxic activity of neutrophils in the NBT-test, the level of serum immunoglobulin A, M, G.

Application of Xymedon against TT in patients of group II contributed to the reduced number of CD3 + - and CD4 + - more than 1.5-fold, and CD8 + - - 1,8 times, thus, there was recovery in CD4 + - to the norm and normalization immunoregulatory index CD4 + - / CD8 + -. When compared with the indicators I (TT) group showed a significant difference in CD3 + - and CD4 + - from the end of the first week and CD8 + from the second week ($p < 0.05$), while in group I had a negative dynamic performance.

Application of dimephosphon against TT in patients of group III to an increase in the number of CD3 + - and CD4 + - 1,3 times, and CD8 + - - 1,6 times, thus, there was recovery in CD4 + - to normal and normalization of immunoregulatory index CD4 + - / CD8 + -. When compared with rates in group I there was a significant difference in CD3 + -, CD4 + and CD8 + - from the end of the second week. Fundamentally important in the action Xymedon and dimephosphon a reduced ability to increase the number of CD8 + -, containing predominantly suppressor cells. Study of suppressive activity of lymphocytes in ConA-induced suppression test showed that the use of Xymedon and dimephosphon against TT led to normalization of not only the number of suppressor cells, but also stimulated their functional activity. The index of suppression in groups II and III increased to the level of donors to the third week of treatment, significantly exceeding the rate of group I have since the first week of observation ($p < 0,05$). Results of the study of functional activity of lymphocytes in the test RBTL with PHA revealed an active and stimulating effect Xymedon dimephosphon the oppressed indicators of immunity. Stimulation index in groups II and III patients was significantly increased in the first week of treatment, exceeding the original data by the end of treatment in the third week in group II in 3, while in group III in 2,4 times, remaining, however, below the level of donors.

A comparative study of the bactericidal and cytotoxic activity of neutrophils in the NBT-test in the application of Xymedon in contrast to group I by the end of the third week significantly decreased compared with baseline data rate of spontaneous NBT-test ($p < 0,05$) and a more pronounced rate increase induced NBT-test ($p < 0,05$). INBT index in group II by the end of the third week was significantly higher than in I group. In this case, both indicators at the end of the third week reached the control (respectively, $p > 0.05$ and $p > 0,05$). By the third week in group II was increased in 1,7 times (group I in 1,4 times), the coefficient of functional activity of neutrophils (CAN) ($p < 0.05$) and 1.8-fold (group I in 1,4 times) - an index of stimulation of neutrophils (EC) ($p < 0.05$), with rates did not differ from control ($p > 0,05$).

In the study of bactericidal and cytotoxic activity of neutrophils in the NBT-test in the application dimephospon the end of the third week revealed unreliable decrease compared with the baseline data rate sNBT-test ($p > 0,05$) and a significant rate increase INBT-test ($p < 0,05$). Indicators sNBT test and iNBT test in group III at the end of the third week did not differ from those of patients in group I. The indicator sNBT test by the end of the third week reached the control ($p > 0,05$), and the index iNBT-test remained below control ($p < 0,05$). By the third week in group III was increased to 1.5 times the rate of functional activity of neutrophils (CAN) ($p < 0,05$) and index of stimulation of neutrophils (EC) ($p < 0.05$), while rates remained significantly lower than target.

Application of Xymedon and dimephospon contributed to the rapid reduction of elevated titers of IgA and IgM, in groups II and III of these immunoglobulins was significantly lower than in group I to II weeks of treatment, and the number of IgA reaches the level of donor II week ($p > 0,05$; $p > 0.05$). Study the dynamics of normalization of IgG detected in group II at the end of I week of treatment, and in group III - by the end of the week II treatment, whereas in group I, the difference with a group of donors increased during treatment.

The combined treatment of patients RHD recommended methods immunorehabilitation, including the domestic original drugs Xymedon and dimephosphone.

LONG-TERM RESULTS OF THE USE OF DRUGS WITH IMMUNOMODULATING ACTIVITY XYMEDON IN CHRONIC RHEUMATIC HEART DISEASE AFTER INITIAL AND RE-TREATMENT

R.M. Gazizov, E.A. Aczel, N.I. Beilina, L.R. Gazizova
Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia
rugazizov@yandex.ru

According to many researchers in the treatment of patients with chronic rheumatic heart disease (RHD) has a high efficacy possessing immunocorrective action (Grinevich YA, 1989; Perederin VG et al. 1989; Karaulov AV, 1999; Zemskov AM et al ., 2008). In the available literature, we found no studies that reflect the long-term results of taking medication with immunomodulatory activity in patients with chronic rheumatic heart disease. In this connection it is interesting to study the dynamics of immune status in patients RHD after initial and repeated courses of treatment to domestic immunomodulatory drug Xymedon.

RHD 22 patients 6 months after completion of the course of a complex antirheumatic therapy with the inclusion of Xymedon held a second 3-week course of treatment Xymedon. After the end of re-treatment and 6 months were determined by the number of CD3 +-T-lymphocytes and their subpopulations of CD4 + - and CD8 +-T lymphocytes by indirect immunofluorescence analysis using monoclonal antibodies, the functional activity of lymphocytes in the test RBTL to PHA and in the test of ConA-induced suppression and the level of serum immunoglobulin A, M, G.

By all indicators studied the results of re-treatment Xymedon exceeded the results I course. 6 months after re-treatment Xymedon number of CD3 + -, CD4 + - and CD8 +-T-lymphocytes in patients RHD significantly exceeded the rates before I year of treatment and not significantly higher than rates at 6 months after I year of treatment. The index of suppression and stimulation index at 6 months after re-treatment were significantly higher than before I treatment and 6 months after I year of treatment. Levels of IgA and IgM within 6 months after re-treatment remained significantly lower than before treatment, and I doubtfully lower than 6 months after I year of treat-

ment, and the level of IgG - insignificantly higher rate before I year of treatment and 6 months after I treatment.

Xymedon influence on immune status of patients RHD after repeated course was more pronounced than after I year. Residual effect immunocorrective Xymedon 6 months after repeated course in almost all respects a somewhat higher residual effect of complex therapy with Xymedon.

CONSTRUCTION OF CONJUGATES ANTIBODIES TO DNA WITH GOLD NANOPARTICLES AND EVALUATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

E.I. Galyamutdinova, T.A. Nevzorova

Kazan (Volga) Federal University, Department of Biochemistry,
Kazan, Russia
amandi@list.ru

Antibodies to DNA (Ab to DNA) are markers of various autoimmune diseases and they can perform a pathological role in the development and progression of these diseases. But a mechanism of action of antibodies to DNA in cells is not known.

To study the mechanism of interaction and visualize of the penetration of antibodies to DNA into cells we are needed into attached of probes to the antibody. As a probes can serve a variety of nanoparticles of noble metals, but gold nanoparticles possess stability, biocompatibility and their easy to obtain.

The aim of this work was a construction of conjugates antibodies to DNA with gold nanoparticles and evaluation of their biological activity in cell culture *in vitro*.

Gold nanoparticles with average diameter of 54 nm were obtained by reduction tetrachloroaurate (III) hydrate by sodium citrate.

After optimizing the conditions were obtained conjugates of gold nanoparticles with basic IgG antibodies to DNA of patients with SLE, RA and healthy donor.

The second stage of this report was to investigate an effect of derived conjugates on viability and metabolism of cells SPEV, MDCK and monocytes of healthy donors. Morphology of the cells studied by optical, fluorescence, atomic force microscopy.

It was shown that an incubation of the cells with conjugates of gold nanoparticles with antibodies to DNA was changed a metabolism of the cells by contrast to controls.

The results are discussed in the report.

INFLUENCE OF PREPARATIONS AN ALPHA- INTERFERONS ON OXYGEN METABOLISM OF NEUTROPHILS OF A PERIPHERIC BLOOD PATIENTS OF A HEPATITIS C (EX-VIVO)

N.O. Zinkevich¹, J.M. Sozinova¹, S.V. Tkachyova¹, I.M. Sayfullin²

¹ – Kazan State Medical University, Kazan, Russia

² - Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

zinkevich_oleg@mail.ru

Research objective: to study ex-vivo influence of preparations of alpha interferon on reactance of neutrophils in reactivity luminol-dependent chemiluminescence (CL) at patients with a chronic hepatitis C (VGC) during the combined antiviral therapy (CAVT).

Introduction. One of the most frequent complications of the combined antiviral therapy sick of an infectious hepatitis With are exacerbations of chronic inflammatory diseases and occurrence of the new centres of an inflammation which demand from the doctor to stop treatment, or to reduce preparation doses that essentially reduces efficiency of treatment. As the first and most powerful mechanism of protection of an organism from the infections causing an inflammation, is opsonophagocytosis of neutrophils, we have decided to study, as function of an oxygen metabolism of this link of protection at anti-virus therapy varies.

Material and research methods. It is surveyed 86 patients with VGC (54 men, 32 women) on different terms of treatment. To all patients spent KIIBT. Spontaneous and induced luminol-dependent chemiluminescence the neutrophils discharged from a peripheral blood with a sedimentation in a solution of dextran T-500. As stimulus used a vaccine of a St.aureus, opsonized of pooled human serum. For studying of direct action of alpha-interferon on functional activity

PMNL on reactionary medium enter the drug used in therapy in therapeutic concentration counting on weight kg was weight. For an estimation of reactivity of neutrophils considered peak in imp/ minutes, time of approach of peak in sec. and total of quantity impulses allowing to estimate all microbicidal potential of cells bound to active forms of oxygen. Calculation spent on 100 000 neutrophils.

Results: As a whole reactivity of neutrophils of patients was various and is noted dependences on terms of therapy 1142400 ± 67800 imp/minute (fluctuations from 357400 to 2171100 imp/minutes/100 of thousand PMNL). Average time of approach of peak made $400 \pm 34,46$ sec (fluctuations from 120 to 820 sec). The general light emission made 12021111 ± 1011880 imp./100 000 leucocytes with fluctuations from 4 050 000 to 31 870 000 impulses. At addition on reactionary medium reaction of neutrophils to stimulus it was parted on three types of the answers. The first answer included patients in whom interferon addition caused CL -answer intensifying, in the second reduction of the answer of neutrophils in the presence of interferon and the third group did not react to interferon.

In the first to group (N=28) time of peak without interferon has made 512 ± 75 sec, with interferon 460 ± 77 sec ($p=0,40$). The peak without interferon has made 840330 ± 98576 imp/min., with interferon - $1\ 279\ 810 \pm 148\ 471$ imp./min ($p=0,034$). The general light emission without interferon made $13\ 786\ 000 \pm 2\ 110\ 690$ impulses, with interferon - $10\ 523\ 000 \pm 2\ 037\ 525$ impulses ($p=0,0798$). Authentic differences are taped only on peak size.

The second group (N=24), answering by dropping of reactance of neutrophils in the presence of interferon had following parameters. Time of offensive of peak - $441,8 \pm 64,6$ seconds without interferon, with interferon - $406,4 \pm 61,1$ seconds ($p=0,55$). The peak without interferon has made $1\ 283\ 100 \pm 130137$ imp/minute, with interferon - $934\ 982 \pm 84\ 879$ imp/minutes ($p=0,000147$). The general light emission without interferon - $14\ 392\ 727 \pm 2\ 303\ 110$ imp., with interferon - $10\ 220\ 000 \pm 1\ 351\ 843$ imp. ($p=0,0056$).

The third groups (N=34), neutrophils which did not react to interferon presence, had following indicators: time of peak without interferon $305 \pm 33,5$ s., with interferon - $336 \pm 44,9$ second ($p=0,296$); the peak without interferon has made $1\ 201\ 214 \pm 89606$ imp/mines, with interferon - $1\ 191\ 086 \pm 87163$ imp/mines ($p=0,64$); the general light

emission without interferon - $11\ 132\ 143 \pm 1\ 070\ 098$ imp., with interferon - $11\ 278\ 571 \pm 1397263$ imp. ($p=0,839$). Thus, in the third group it is not taped authentic differences on one parameter.

Conclusion. In our opinion such distribution of reactivity of neutrophils of patients being on antiviral therapy represents certain clinical interest and requires the further studying. At a hyper reactivity of neutrophils in the presence of interferon (it is similar to conditions in-vivo after an interferon injection) exacerbations of chronic inflammatory diseases as such hyperreactivity, as a rule, is accompanied by emission lisosomal granules are possible and leads to damage of tissues to the locus of an inflammation with all clinical consequences. On the other hand depression of reactivity of neutrophils in the presence of interferon reduces protective, microbicidal potential of this cellular link and can be a condition of more serious course of accompanying diseases and to occurrence of the new locus of an inflammation.

PREDICTIVE SIGNIFICANCE OF INVESTIGATION OF NATURAL ANTIBODIES AGAINST RENAL ANTIGENS IN CHILDREN

S.V. Maltsev, G.Sh. Mansurova
Kazan State Medical Academy,
Kazan, Russia gsm98@mail.ru

Pyelonephritis (PN) in children of first months of life and especially in newborns is complicated to diagnose due to un-specific clinical picture and few symptoms. PN discovered in more than $2\backslash3$ of children only because of targeted investigation, which demonstrate the high rate of latent clinical course of PN in children of first months of life. Known, that dystrophic and destructive changes of renal parenchyma cells occur long time in advance before the clinical manifestation of PN. In our work we investigated the change of serum content of against proteins of renal parenchyma as early pre-clinical sign of pathological process in kidneys in children with high risk of PN development.

The aim of this work was to investigate the production disorders of natural autoantibodies in pre-clinical stage of PN development in children of early ages.

56 children were under observation from the moment of birth till age of 3 years. All children were born from mothers with hestation PN and compromised obstetrical history, which is the risk factor of PN development in children. In the control group there are 25 children, who had born from healthy mothers without signs of urinary system disease. The level of natural Ig G auto-Abs against proteins of renal parenchyma - KiM-05-40, KiM-05-300, KiS-07-120 – was investigated twice by immuno-enzymatic test-system ELI-TEST.

37,5% of newborns had abnormally high level of autoantibodies against kidney antigen. Increasing of all levels of investigated autoantibodies was detected in majority of children (71,4%). The total amount of children with increased level of nephrotropicautoantibodies in repeated re-investigation, done in 6 months of age, ascended up to 53,8%. Important, that all newborns with abnormally high level of nephrotropicautoantibodies had increasing of same autoantibodies at age of 6 months. We established the direct reliable connection between concentration of autoantibodies against renal proteins in newborn period ($r=+0,86$) and presence of mothers' hestation PN. All children from group with abnormally high autoantibodies level in newborn period had afterwards the reliable increased level of natural autoantibodies against renal antigens. During the period of observation, rate of PN among the children who had high level of autoantibodies in newborn period was 90,4%.

Conclusion: increased level of natural autoantibodies against renal antigens in blood serum of newborns can be used as pre-clinical sign of PN development.

PATHOGENETICALLY PROVED DIFFERENTIATIVE THERAPY OF CHRONIC CERVITITES AND HPV IN WOMEN

L.I. Maltseva, L.N. Farrahova

Department of Obstetrics and Gynecology № 1, Kazan State Medical
Academy, Kazan, Russia
lifara@mail.ru

The problem of therapy of chronic cervicitis today is very urgent. Initiators of inflammation of the cervix are different viruses and bacteria, but the presence and knowledge of the pathogen does not always determine the effect of treatment. Due to increased production of 16α -hydroxyestrone decreased effectiveness of treatment with interferon by blocking the antiviral immune defense.

The aim of the study was the choice of differentiated treatment of chronic cervicitis in women, depending on the ratio of estrogen metabolites and identified infection.

180 patients with chronic cervicitis were examined. General clinical examination, PCR diagnosis of specific infections, conventional and liquid cytology smears, colposcopy, determination of the ratio of metabolites 2-hydroxyestrone to 16α -hydroxyestrone (2-ONE1/ 16α -ONE1) in urine was carried out.

HPV infection was detected in 38 (21%) women. Liquid cytology revealed CIN in 44 women (in 19 - CIN I, 15 - CIN II, 10 - CIN III). In 75 women with chronic cervicitis were found normal ratios 2-ONE1/ 16α -ONE. In 105 patients the level of estrogen metabolites has been broken. Patients with normal exchange of metabolites of estrogen have been used antiseptics, interferon inducers, and if necessary, antibiotic therapy was carried out. Patients with abnormal ratios of estrogen metabolites 2ONE1/ 16α -ONE1 treatment started with promisan 2 capsules, 2 times a day to 6 months. Antiviral drugs and interferon inducers have started to apply only to the third month of promisan. Positive clinical effect was obtained in all patients, ratio levels of estrogen metabolites was normalized and HPV infection was eliminated. Colposcopic and cytological picture of inflammation persisted in 8% of patients, so that additional therapy was required.

Thus, definition of estrogen metabolites ratio in urine allows to apply differentiative approach to treatment of patients with chronic cervicitis and can reasonably be used promisan in the complex therapy, due to its high efficiency.

IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF THE EXPRESSION P16ink4 α BASED ON LIQUID CYTOLOGY IN THE DIAGNOSIS OF EARLY FORMS OF CERVICAL CANCER IN WOMEN WITH CHRONIC CERVITITIS AND HPV- INFECTION

L.I. Maltseva, L.N. Farrahova

Department of Obstetrics and Gynecology № 1, Kazan State Medical
Academy, Kazan, Russia

lifara@mail.ru

Cervical cancer is second among cancers in the world and ranks first among the causes of maternal mortality in developing countries. It is known that the etiologic agent of cervical cancer is HPV. The mechanism of carcinogenesis begins when the virus integrates into the cellular genome, which leads to the activation of oncoproteins E6 and E7. Protein p16ink4 α prevents uncontrolled cell proliferation. Overexpression p16ink4 α is a sign of cervical lesions and may serve as an early marker of cervical cancer.

The aim of the study was early diagnosis of non-invasive cervical cancer in women using liquid cytology and immunocytochemical study of the expression p16ink4 α .

We examined 547 women of reproductive age with symptoms of chronic cervicitis and HPV infection. General clinical examination, PCR diagnosis of specific infections, fluid cytology, colposcopy, morphological study of biopsy, immunocytochemical examination of smears on the p16ink4 α were performed.

HPV infection is associated with Chlamydia (7.6%), Ureaplasma (13,2%), Mycoplasma (10,3%), herpes viruses (8%) and other opportunistic flora (50%). Liquid cytology revealed CIN in 169 (31%) women (in 68 - CIN I, 58 - CIN II, 43 - CIN III). P16ink4 α protein was detected in 65 (8.4%) women and only in patients with CIN. After histological examination of biopsy Ca in situ of the cervix confirmed.

P16ink4 α protein is a reliable marker, allowing to evaluate the potential of CIN on the development of cervical cancer. Test for protein p16 ink4 α is an additional test for the early diagnosis of cervical cancer.

THERAPY OF HPV-ASSOCIATED CHRONIC CERVITITIS IN WOMEN

L.I. Maltseva, L.N. Farrahova

Department of Obstetrics and Gynecology № 1, Kazan State Medical
Academy, Kazan, Russia
lifara@mail.ru

The aim of the research was to evaluate the effectiveness of Ferrovir treatment of HPV in women with chronic cervicitis compared with interferon inducers genferon.

Materials and methods: we investigated 28 women with symptoms of chronic cervicitis and HPV infection. By type of therapy the patients were divided into 2 groups. The first group included 15 women who received interferon inductor genferon. In the second group had 13 patients who were treated with the Ferrovir. Treatment efficacy was assessed after 6 and 12 months after treatment with the use of colposcopy, cytology and PCR studies.

Results. Positive clinical effect was obtained in all patients. 6 months after the treatment of HPV infection detected in 5 patients of the first group, and after 12 months of papillomavirus has been detected already in 8 women. Patients of the second group were 100% elimination of the virus.

Thus, the use of Ferrovir can achieve better results of treatment of HPV infection, which allows its use as an immunomodulatory and antiviral agent without the drugs interferon.

POLYMORPHISM OF THE ENDOTHELIUM NO-SYNTASE GENE IN THE CASE OF THE PREECLAMPSIA DEVELOPMENT IN THE PRIMIPARA WOMEN

L.I. Maltseva, T.V. Pavlova

Introduction: Preeclampsia is one of the most prevalent complications of pregnancy, the reasons for it are not clearly denoted. The frequency of preeclampsia in Russia is up to 20%. There are data which evidence for genetic predisposition of this condition.

The genetic factors which seem to be associated with preeclampsia development are genes MTHFR, its variation MTHFR-C677T, AGT-M235T, ACE I/D, prothrombin gene, NO-synthase gene, mutation of the Leiden's V factor, deficit of C and S proteins etc.

Nitrogen oxide is the basic endothelial factor of relaxation taking part in the support of the tone of the vessel wall and in thrombogenesis. Function of NO is to lower the activity of the contractile system of smooth muscle cells in the vessels and to suppress the adhesion of circulating platelets and leucocytes to the vessel endothelium, as well as to regulate the parietal hemostasis. Constitutional endothelial NO-synthase type 3 (NOS3, eNOS) takes part in the synthesis NO, so in the regulation of vessel tone, blood flow and arterial blood pressure. The product of endothelial NO-synthase encoded by the gene NOS3(eNOS) is endothelial hypotensive factor, e.g. nitrogen oxide (NO). Allelic variants of this gene bring to the decrease of the level of expression of NO-synthase, and as a result to the decrease of the body resistance to the hypertensive influence of external and internal media.

The polymorphism of genes of NO-synthase is associated with different obstetric pathologies in the basis of which changes of the vessel tone (preeclampsia, placental insufficiency, fetus IGDR) are.

The preeclampsia is especially unpredictable in primipara women. Its relation to genetic factors is extremely interesting. In the connection with this, the aim of this study was to investigate the association of functionally important polymorphic versions of the endothelial NO-synthase gene with the development of preeclampsia in primipara. Materials and methods: 108 primipara women with gestational age 27-37 weeks were included: 38 of which had preeclampsia with various severity (20 – easy, 10 - moderate, 8 - severe); 50 of them had high risk of preeclampsia development (obesity – 10, hypertensive type of the neurocirculatory dystonia - 17, pyelonephritis – 23) and 20 completely healthy primipara.

Besides common clinical investigations there were studied blood samples for the detection of the polymorphism of E298D with the aid of restriction analysis and polymorphism of the 4a/4b gene of NOS3 in all patients. The gene NOS3-E298D, 4a/4b is responsible for the synthesis of the enzyme NO-synthase (eNOS), which participates in the synthesis of nitrogen oxide by the endothelium, and so in the regulation of vessel tone, blood flow and blood pressure.

Results: There were detected normal versions of the gene eNOS3-E298E, 4b/4b in all pregnant women of the control group.

In the risk group, there was detected the polymorphism of the gene NOS3-E298D, 4a/4b, where B and 4a alleles increase the risk of the development of the obstetric pathologies, such as preeclampsia, placental insufficiency, fetus IGDR, but only in the presence of potentiating factors. As distinct from the women of the risk group in the women with gestosis there were detected mutational polymorphic versions of the gene eNOS3.

There was revealed the mutational version of gene in allele NOS3-D298D, 4b/4b in the 10 women with mild preeclampsia. All of them had fetus IGDR and hypamnion.

Women with moderate to severe forms of preeclampsia had mutational version of the gene in the 4a allele – NOS3-4a/4a, which was accompanied by earlier occurrence of edemas, proteinuria and active demonstration of DIC-syndrome. From these, one pregnant woman with moderate gestosis and two with severe preeclampsia also had homozygotic type of D298D polymorphism of the gene NOS3. In the case of moderate to severe preeclampsia fetus IGDR of II – III stage was revealed clinically, as well as early and severe flow of preeclampsia.

The studies have shown that the genotype 4b/4b corresponds to maximum high level of basal NO, whereas in women with genotype 4a/4a the level of NO is twice lower. Heterozygotic types of mutations are in intermediate positions according to the level of NO.

Conclusions: The polymorphism of the gene NOS3-E298D, 4a/4b in the intron 4 is associated with the high risk of the development of gestosis. Among the women with preeclampsia who care at least 1 allele 4a higher level of blood pressure was detected, and in patients with the genotype 4a/4a earlier and heavier preeclampsia, IGDR and hypoxia of the fetus were revealed. Polymorphic versions of the

gene of endothelial NO-synthase are associated with the development of obstetric pathologies, such as preeclampsia, placental insufficiency and IGDR.

Diagnosis of this polymorphism has the most important meaning in the early gestational ages. The possibility of early pre-symptomatic diagnosis of any obstetric pathology allows to carry on a prophylactic treatment and to suppress the realization of preeclampsia.

GENETIC PREDISPOSITION TO THE PREECLAMPSIA IN PRIMIPARA WOMEN

L.I. Maltseva, T.V. Pavlova

Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

Tatjana-pavlova136@rambler.ru

Preeclampsia remains one of the most common complications of pregnancy with undefined etiology and pathogenesis and with the absence of radical methods of treatment. There is well determined a huge group of conditions such as hypertensive diseases, kidney diseases, obesity which are associated with the high risk of the development of preeclampsia. Among them the major part consists of the patients with kidney diseases. Nowadays a big deal refers to genetic factors.

The genetic factors which seem to be associated with preeclampsia development are genes MTHFR, its variation MTHFR-C677T, AGT-M235T, ACE I/D, prothrombin gene, NO-synthase gene, mutation of the Leiden's V factor, deficit of C and S proteins etc.

There are reported 2 types of the gene of methylenetetrahydrofolatreductase (MTHFR) defined ad a mutation of C677T. In homozygotic people with this mutation a thermolability of MTHFR and decrease of the enzyme activity till 35% of mean value is reported. Such mutation is accompanied by increase of the level of blood homocysteinwhich carries a risk of the nephropaty development in pregnant. Another important aspect of the mutation of MTHFR-C677T is folat deficiency anemia which, in its turn, aggravates hypoxia, the course of DIC syndrome and, so, promotes to the progression of the microcirculatory disturbances and more severe course of preeclampsia.

In the development of preeclampsia the genotypes of angiotensinogen AGT-M235T play a big role. The mutation changes the interaction between rennin and angiotensin converting enzyme which can bring to the development of preeclampsia in the pregnant carriers of the mutations. Recently the new versions of the genotype of the angiotensin converting enzyme (ACE I/D) have been discovered. In patients who are homozygotic by the D allele the level of ACE is twice higher than that in homozygotes by the I allele. The polymorphism of the gene ACE I/D and AGT-M235T is hardly related to the incidence and course of the arterial hypertension out of pregnancy but can be a risk factor for the development of hypertension during pregnancy.

It is obvious that preeclampsia has series of genes of predisposition that's why the determination of genes-candidates, predisposing to the preeclampsia development can be helpful in the determination of groups with higher risk and in the maintenance of effective prophylaxis of this severe pathology. The preeclampsia is especially unpredictable in primipara women. Its relation to genetic factors is extremely interesting. In the connection with this, the aim of this study was to investigate the association of functionally important polymorphic versions of the endothelial NO-synthase gene with the development of gestosis in primipara

Materials and methods: 148 primipara women with gestational age 27-38 weeks were studied. 60 of them were pregnant women with the preeclampsia with different levels of severity (35 - mild, 15 - moderate, 10 - severe). 68 women were without clinical evidence of preeclampsia, but from the group with the high risk (obesity – 10, hypertensive syndrome – 18, pyelonephritis– 40). 20 other women were completely healthy primipara.

In all women, besides general clinical investigations with the evaluation of hemostasiogramm (platelet aggregation: spontaneous and induced, fibrinogen level, APTT, INR, 12a dependent fibrinolysis, AT III, FMSC, FDP, plasminogen, determination of C and S proteins) the blood was investigated by real-time PCR for detection of polymorphism of genes AGT-M235T (angiotensinogen), ACE I/D, MTHFR-C677T. We compared investigated genes with all versions of their mutations (AGT-T235T, ACE D/D, MTHFR-T677T). By the immunochemoluminescent analysis (ICA) we determined the level of folic acid (FA), ACE and rennin-angiotensin (RA).

Results: In the control group of primipara women the molecular-genetic investigation revealed the presence of normal versions of studied genes and RA, ACE. The level of FA was decreased by 15% from the normal level in 8 from 20 pregnant women.

In the risk group, the pregnant women with obesity the mutational version of MTHFR-T677T with the slight decrease of FA and increase of ACE was revealed. One of them had a fetus with malformation (cleft palate). The mutational version MTHFR-T677T also was determined in all women with hypertensive syndrome. One of them had this gene with mutational version of polymorphism of gene ACE D/D and slight increase of the level RA. 14 women with pyelonephritis had mutational version of the polymorphism of gene ACE D/D, twice increase of RA, slight decrease of FA, and according to hemostasiogramm a slight increase of plasminogen and fibrinogen was noticed.

The mutation of investigated genes in pregnant women always was accompanied by sharp decrease of the FA level and significant increase of RA.

In the main group 12 pregnant women with mild preeclampsia had mutational genes: 5 of them MTHFR-T677T, 7 of them had ACE D/D, and 1 of them had combination of these 2 mutational versions. All pregnant women had changes in coagulogramms as an increase of the level of plasminogen and fibrinogen.

Among women with moderate preeclampsia 8 had mutational gene ACE D/D, 7 of them had MTHFR-T677T. When studying hemostasis there was revealed slight increase of D-dimer, plasminogen and fibrinogen.

All pregnant women with severe preeclampsia had combination of 2 mutational versions of genes ACE D/D and MTHFR-T677T, twice increase of ACE. The thrice increase of D-dimer, hyperfibrinogenemia, significant hyperaggregation of platelets, hypercoagulation, decrease of AT-III, which proved the active course of DIC syndrome.

The patients who have mutations in the gene MTHFR, besides preeclampsia, the clinical evidence of IGDR of the fetus was revealed. 2 of them had partial detachment of normal placenta on the gestational age 27-37 weeks.

The expression of mutational genes with the decrease of FA and increase of RA was always accompanied by disturbance in the hemo-

stasis system and by hypertensive system of various severity. Initial signs of DIC-syndrome were reported in the case of mild and moderate preeclampsia, and chronic DIC syndrome was noticed in severe forms of preeclampsia.

Conclusions: The development of preeclampsia in primipara women appears to be genetically determined. Folic-deficiency conditions are additional factors aggravating the pathology.

Revealed characteristics define special approaches to the prophylaxis and treatment of preeclampsia in primipara women.

POLYMORPHISM OF METHYLENTETRAHYDROFOLAT- REDUCTASE AND FOLIC ACID DEFICIENCY AS RISK FACTORS OF THE DEVELOPMENT OF PREECLAMPSIA IN PRIMIPARA WOMEN

L.I. Maltseva, T.V. Pavlova

Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

Tatjana-pavlova136@rambler.ru

Introduction: One of the most prominent problems of modern obstetrics is the problem of the preeclampsia the causes of which are ill defined. There are some data witnessing about the presence of the genetic predisposition to the development of preeclampsia. Preeclampsia is especially unpredictable in primipara women.

A group of genes participating in the folic acid metabolism have been studied recently. High concentrations of the active type of folic acid are necessary for converting the excess of homocysteine to the methionin. Different enzymes participate in the foliate cycle. The main one which maintains the conversion of folic acid on the several levels of the cycle is methylenetetrahydrofolatreductase. The decrease of this enzyme activity is one of the reasons of homocysteine accumulation in the body which harms the vessel endothelium and stimulates thrombogenesis. This brings to the disturbance of placentation and to the insufficiency of fetoplacental blood circulation. On the later gestational ages it brings to the placental insufficiency, retardation of intra-uterine development and chronic hypoxia of the fetus. One of the most

important factors promoting to the increase of the homocysteine level in the blood can be hereditary predisposition.

The polymorphism of the methylenetetrahydrofolatreductase gene is the most studied one. There are described two variations of the methylenetetrahydrofolatreductase (MTHFR) gene known as mutation C677T. Patients who are homozygotic for this mutation have thermolability of MTHFR and decrease of the activity of enzyme till about 35% of the mean value. This mutation is accompanied by the increase of the homocysteine level in the blood which is a risk factor for the development of the nephropathy of pregnant. The increase of the frequency of the allele 677T was noticed not only during preeclampsia but also in other complications of the pregnancy (detachment of the placenta, retardation of the growth of the fetus, antenatal death of the fetus, neural tube malformations, hare lip, cleft palate). Another important aspect of the mutation MTHFR-C677T is folate deficiency anemia which additionally aggravates hypoxia, the course of the disseminated intravascular coagulation and thus, promotes to the progression of microcirculatory disturbances and more severe course of preeclampsia.

In connection with this the aim of this study was to investigate the role of the genetic polymorphism of the methylenetetrahydrofolatreductase gene (MTHFR-C677T) and the folic acid deficiency in the development of preeclampsia and other obstetric pathologies (placental insufficiency, IGDR, premature detachment of the normally located placenta) in the primipara.

Materials and methods: 129 primipara were studied on the gestational ages 27-38 weeks. 60 of them were pregnant women with the different levels of the preeclampsia (25 - mild, 20 - moderate, 15 – severe). 49 women didn't have any clinical evidence of gestosis but they had high risk factors such as obesity in 10 women, hypertensive syndrome - 14 women, pyelonephritis-25 and 20 women were completely healthy primipara.

In all women, besides general clinical investigations with the evaluation of hemostasiogramm (platelet aggregation: spontaneous and induced, fibrinogen level, APTT, INR, 12a dependent fibrinolysis, AT III, FMSC, FDP, plasminogen, determination of C and S proteins) the blood was investigated by real-time PCR for detection of polymorphism of genes MTHFR-C677T. We compared investigated genes

with all versions of their mutations (AGT-T235T, ACE D/D, MTHFR-T677T). By the immunochemoluminescent analysis (ICA) we determined the level of folic acid (FA), ACE and rennin-angiotensin (RA).

Results: In the control group of primipara the normal version of the MTHFR-C677C gene was detected, the findings of hemostasiogram were within normal limits. Folic acid level was decreased in 8 women from 20.

21 women from the risk group had normal version of the gene MTHFR-C677C, 26 of them had heterozygotic version of MTHFR-C677T, where the T allele with combination of additional pathology potentiating factors increases the risk of the development of the complications of the preeclampsia. All these women had slight decrease of the blood level of FA. In two women from the risk group a mutational version of the MTHFR-T677T was detected in combination with signs of the DIC-syndrome and the blood level of FA was decreased twice in these women. One of them had fetus malformation (cleft palate) and slight increase of plasminogen and fibrinogen according to the hemostasiogram.

In pregnant women with preeclampsia the mutation of the gene MTHFR-C677T always was accompanied by the sharp decrease of the FA level.

7 of the 25 women with mild preeclampsia had the normal version of the gene, 13 women had heterozygotic version of MTHFR-C677T which was clinically realized as placental insufficiency, fetus IGDR I-II level, in 5 women with the mutational version of MTHFR-T677T also the IGDR of fetus was noticed, as well as chronic hypoxia of fetus, oligoamnion. The hemostasiogram of all women with mild preeclampsia showed slightly increase of D-dimer, fibrinogen, plasminogen, decrease of AT -III, e.g. initial signs of DIC-syndrome.

Among the women with moderate preeclampsia 12 had mutational version of MTHFR-T677T, 8 had heterozygotic version of MTHFR-C677T. 7 primipara with severe preeclampsia had heterozygotic version of MTHFR-C677T and 8 of them had MTHFR-T677T. All these women were diagnosed to have chronic DIC-syndrome which progression in 2 pregnant women with the mutational version MTHFR-T677T brought to the premature detachment of normally located placenta.

Finally, the combination of the mutation of the MTHFR-T677T gene with the FA deficiency in pregnant is always accompanied by chronic DIC-syndrome of various severity and hypertension. The decrease of FA level during pregnancy in the case of normal version of MTHFR-C677C gene doesn't bring to the development of hypertensive syndrome but frequently is realized as placental insufficiency and fetus IGDR.

It seems that the detection of the FA level as well as the factors of intravascular coagulation and markers of inborn defects of the hemostasis system (polymorphism of C677T in the MTHFR gene) is a prognostically significant factor in the diagnosis of preeclampsia, partial detachment of normal placenta, placental insufficiency, IGDR and congenital malformations of the fetus.

THE ROLE OF CYCLIN A1 IN HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELLS

R. Miftakhova¹, A.Hedblom¹, A. Bredberg², J. L.Persson¹

¹ - Division of Experimental Cancer Research, Department of Laboratory Medicine, Lund University, SUS, Sweden

² - Department of Medical Microbiology, Lund University, SUS, Sweden

Background: The A-type cyclin, cyclin A1, has been found to be overexpressed in patients with hematopoietic malignancies. Further, targeted overexpression of cyclin A1 in myeloid progenitor cells initiated acute myeloid leukemia in transgenic mice. Human cyclin A1 expression was detected in normal CD34+ hematopoietic stem cells.

Aims: Investigate the role of Cyclin A1 in normal hematopoiesis using a mouse model in which gene that encoding cyclin A1 has been deleted in germ lines (Ccna^{-/-}).

Methods and Results: We have been characterizing the hematopoietic stem cells and subpopulation of myeloid and lymphoid lineages by using mouse models. We have performed flow cytometry sorting and detailed analysis on different subsets of hematopoietic cells, including stem cells, myeloid and lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cyclin A1 deletion had significant impact on

cell cycle, LSK cell number and migration ability. Treatment of stem cell-enriched population with UV-irradiation, staurosporine, etoposide and TNF α showed that Cyclin A1 is involved in apoptotic and DNA-damaging pathways. Bone marrow transplantation of stem cell-enriched population into non-irradiated and sub-lethally irradiated recipients demonstrated that Cyclin A1 has function in stem cell homing and lodging.

Conclusions: These results suggest that cyclin A1 has an important function in the regulation of hematopoiesis, in particular, hematopoietic stem cell maintenance.

HYPOMETHYLATION OF MONONUCLEAR BLOOD CELLS' DNA OF THE PATIENTS WITH AUTOIMMUNE DISEASES

R.Kh. Mukhametshina ¹, J.V. Filina^{1,2}, M.I. Arleevskaya²,
A.G. Gabdoulkhakova ²

¹ – Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Russia,

² – Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia,
riana.mukhametshina@gmail.com

Chemical modification of DNA can lead to alteration of chromosome structure and consequently to changes in the gene expression; it could be a result of exposure of reactive oxygen species. Almost all inflammatory processes, including autoimmune diseases, are accompanied by oxidative stress.

Whole genome methylation and DNA methylation of the regulatory region of the genes is one of the most important mechanisms of heredity regulation. Abnormal methylation is associated with a number of serious pathologies: from congenital malformations to cancer and other diseases. Methylation of DNA in autoimmune diseases is poor known. Possibly the pattern of methylation or demethylation of specific genes is responsible for the immune cells dysfunction, and even could be a reason of inheritance and development of autoimmune diseases.

Backgrounds for the study were the following:

- it is known that genetic (first degree) relatives of patients with autoimmune diseases have a high risk of developing of this disease;
- we found that leucocytes of peripheral blood of RA patients and their relatives have an increased oxidase activity;
- genetic markers/mutations of genes responsible for the development of the rheumatoid arthritis (RA) and systemic sclerosis (SS) aren't identified until now and autoimmune diseases possibly have an epigenetic origin.

In this regard the goal of our investigation was to determine the total level of DNA methylation of mononuclear blood cells in the groups of patients with SS (n=12) and RA (n=21) and their relatives (n=11) comparing with healthy donors (n=7) which haven't a hereditary predisposition to these diseases.

Isolation of genomic DNA was performed by the standard method using a "QIAGEN" DNeasy Blood and Tissue Kit, the concentration of DNA in the samples was measured and the restriction was carried out using restriction enzymes MspI and HpaII. Separation of DNA was performed in 1% agarose gel.

We observed about 0.05-0.5% fragmentation of DNA in the samples without treatment with restriction enzymes. Under the action of restriction enzyme Msp I almost complete restriction of genomic DNA is occurred: methyl-insensitive restriction enzymes cleave DNA regardless of whether methylated or unmethylated cytosine is in its recognition site. Methyl-sensitive restriction under the influence of Hpa II causes some degradation of DNA, which depends on the total level of cytosine methylation at the restriction sites.

To assess the extent of DNA fragmentation we used densitometry analysis by TotalLab (v2.01). Statistical analysis was performed using interval estimates with 95% confidence interval and the Student's t-test.

Normally 80% of all human's CpGs are methylated. In our studies, the percentage of DNA methylation in donors was $71 \pm 12.1\%$. We found a significant decrease of total DNA methylation for RA and SS patients' cells ($47.7 \pm 20.6\%$ and $48.2 \pm 22\%$, respectively), and for RA patients differences were reliable ($p \leq 0.05$). Relatives of RA pa-

tients also have a tendency to decrease of total DNA methylation ($60.5 \pm 21.8\%$).

In patients with autoimmune diseases the decrease of total DNA methylation can be explained by the activation of immune cells that accompanied by expression of new proteins, such as inflammatory cytokines IL-2 and TNF-alpha. Surprisingly, RA relatives with no signs of the disease also tended to reduce the total DNA methylation.

Epigenetic modifications of genome are used as potential biomarkers for the diagnostics and prediction of number of diseases, especially cancer. On the basis of our data we cannot say whether the decrease in DNA methylation causes development of autoimmune disease yet, or it's only a consequence of oxidative stress. To clarify this further studies of specific genes are needed.

Thus, we've shown that patients with autoimmune disease characterized by total hypomethylation of genomic DNA. Also it was revealed the tendency to decrease the total DNA methylation in the group of RA relatives with no signs of autoimmune diseases.

The project was supported by RFBR № 09-04-97053

ROLE OF EXTRACELLULAR CALCIUM IN LEUKOCYTE RESPIRATORY BURST IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE DISEASES

Thi Nga Nguen¹, J.V. Filina^{1,2},

M.I. Arleevskaya², A.G. Gabdoulkhakova²

¹ – Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Russia

² – Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

Nn7189@gmail.com

Leukocytes engulf bacteria and dead cells and simultaneously generate reactive oxygen species (ROS) to enhance the degradation of macromolecules. The release of ROS is mediated by the activation of NADPH-dependent oxidase. Malfunction of leukocytes is observed in autoimmune diseases. Excessive production of ROS does not only kill the bacterial cells but also damage own tissues. Therefore, the activity of NADPH - oxidase is tightly regulated. Ca^{2+} ions and Ca^{2+} -dependent signaling systems play important role in this process.

The aim of this work was to study the role of extracellular Ca^{2+} in the respiratory burst of isolated leukocytes, induced by formyl methionine-leucine-phenylalanine (fMLP) and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) in the groups of patients with autoimmune diseases, their relatives and healthy donors. ROS production was assessed by luminol-dependent chemiluminescence. We compared the spontaneous levels of ROS production in the cell suspension and the maximum amplitude of the responses to stimulation.

The experimental groups consisted of 18 patients with advanced rheumatoid arthritis (RA) (disease duration is more than 3 years), 11 patients with early RA (disease duration is less than 3 years), 10 RA immediate relatives, 8 patients with systemic scleroderma (SS) and 6 healthy women with no hereditary predisposition to AID. Blood samples from relatives were taken only in the absence of clinical signs of inflammation and infection.

Increased spontaneous levels of ROS production was observed in groups of patients and their relatives compared to the healthy donors. This could be a result of cells priming by pro-inflammatory factors or other agents. Tendency to the increase of the response to fMLP in RA patients and their relatives was observed whilst in patients with SS the response to fMLP was decreased.

Signaling pathway of NADPH-oxidase activation by fMLP goes through the number of enzymes, including phospholipase C (PLC). PLC cleaves lipids and catalyzes hydrolysis of PIP₃ to diacylglycerol (DAG) and inositol triphosphate (IP₃). DAG activates a family of protein kinases C (PKC). There are Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent PKCs. IP₃ is involved in the release of calcium ions from intracellular stores, which leads to additional activation of PKC. Moreover, DAG and Ca^{2+} synergistically enhance the translocation of PKC to the plasma membrane, thereby facilitating the assembly of the components of NADPH-oxidase.

Ca^{2+} ions play an important role in regulation of ROS generation. In our experiments the absence of extracellular Ca^{2+} led to decrease of spontaneous level of ROS production especially in RA relatives, early RA and SS patients. Perhaps due to the repeated cell activation the intracellular Ca^{2+} store is depleted.

In the calcium-free medium the fMLP-induced ROS production decreased in the RA and SS patients' cells compared to donors' ones.

It's known that concentration of cytoplasmic calcium increases in response to fMLP. This occurs due to the release of calcium from calcium storage organelles and the influx of extracellular calcium. Perhaps, violations of Ca^{2+} storage and transport are occurred in patients and their respiratory response is more dependent on extracellular calcium entry. Or, possibly the Ca^{2+} - dependent protein kinase C is involved in the changing of fMLP-induced oxidase activity.

We used a synthetic analogue of DAG, phorbol ester (PMA), to direct activation of PKC. Under PMA stimulation the respiratory burst was increased in autoimmune patients and their relatives. It could be due to malfunction of Ca^{2+} -dependent PKCs.

PMA-induced respiratory response develops without the generation of IP_3 , which mobilizes Ca^{2+} from intracellular storages. Thus, in the calcium-free medium the PMA-induced response realizes mainly by Ca-independent PKCs. The removal of extracellular Ca^{2+} virtually has no effect on ROS production under the stimulation of the leucocytes by phorbol ester. That is, the increased respiratory response of patients' leucocytes could be due to additional activation of Ca^{2+} -dependent PKCs.

So, the influx of extracellular Ca^{2+} is needed for realization of the complete respiratory response. In RA patients and their relatives respiratory burst is increased and more dependent on external calcium that can be a result of dysfunction of Ca^{2+} -dependent PKCs.

The project was supported by RFBR № 09-04-97053.

EFFECT OF IGG-ANTIBODIES TO DOUBLE-STRANDED DNA ON HUMAN IMMUNOCOMPETENT CELLS

A.Z. Sabirzanova, T.A. Nevzorova
Kazan (Volga) Federal University,
Kazan, Russia

Systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis are severe autoimmune diseases characterized by a wide spectrum of clinical and serological manifestations. Often these diseases occur in people already in adolescence, leading to disability. Unfortunately, every year the number of patients with autoimmune pathologies increases.

The level of antibodies (Ab) to double-stranded DNA (dsDNA) is an important indicator of the autoimmune process, especially in SLE. But the recent studies show that not only level and greater the properties of Ab are important in the pathological process.

The aim of this study was investigation of the effect of IgG Ab to dsDNA on the human blood immunocompetent cells in vitro.

Assessment of changes in metabolism, cell proliferation and viability under the influence of Ab to dsDNA showed that Ab from healthy donors and SLE patients in the acute stage of disease show similar effects on cells – inhibit the proliferation, reduce the uptake of glucose and content of protein, lead to significant cell death. SLE-Ab to DNA that have DNA-hydrolyzing activity, exhibit a more visible cytotoxic and genotoxic effect.

In this case, the charge of Ab is more important than their affinity for antigen. Positively charged Ab to dsDNA of donors and SLE-patients in the acute stage of the disease exhibit greater cytotoxicity compared to the negatively charged IgG-Ab from the same sera.

It is shown that in rheumatoid arthritis the main pathological role probably belongs to the high-affinity Ab to dsDNA, regardless of the charge. In addition, effect of Ab of healthy relatives on the cells illustrates the potential pathogenicity of high-affinity Ab to dsDNA of relatives, even though they have no clinical manifestations of rheumatoid arthritis.

The report discusses the biological role of IgG-Ab to dsDNA in health and pathogenesis of SLE and rheumatoid arthritis.

EFFICACY OF ANTIOXIDANT AND DICLOFENAC SODIUM IN TREATMENT OF RAT ADJUVANT ARTHRITIS

Sabirova A.Ya., Zalyalyutdinova L.N.,

Nasybullina D.A., Petrova A.A.

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Introduction. Alpha-lipoic acid (LA) is a unique antioxidant which is soluble in both aqueous and lipid media. This lets her circulate in blood as well as get into the cells. LA is a popular research target for researchers all around the world. We designated this study to reveal anti-inflammatory activity of LA at oral administration in comparison with sodium diclofenac (DF) on a model of rheumatoid arthritis (RA) - adjuvant arthritis (AA) in rats.

This type of experimental arthritis was chosen, because subplantar injection of complete Freund's adjuvant produces contralateral arthritis, repeating basic human RA peculiarities: synovitis and formation of pannus, synovial hyperplasia, infiltration of inflammatory cells into the synovial tissue, synovial hyperalgesia and erosion of the articular cartilage and bone. Moreover, adjuvant arthritis modeling represents major cytokines and biological factors in the synovium and cartilage at human RA.

Materials and methods. AA was modeled in 65 white non-linear rats of 220 ± 20 g of both sexes by subplantar injection of 0,1ml of complete Freund's adjuvant into the rats' right posterior paw. Animals were treated with vehicle, mean therapeutic dose of DF and LA dosed 1/10, 1/100 and 1/200 of DL50 respectively. The treatment started on the 12th day after adjuvant injection and lasted for 14 days. Paw edema was evaluated oncometrically, by means of IR termography and blood count. Student's t-test was used for statistical evaluation. $P<0,05$ was considered statistically significant.

Results. Primary inflammatory reaction was formed on the third day (mean increase in right paw volume was $66\pm 5\%$). By the end of the experiment (at day 25) it reached $76\pm 5\%$ in negative control and vehicle group. LA dosed 1/10 and 1/200 of DL50 almost deleted adjuvant-induced primary inflammation. LA dosed 1/100 of DL50 was not that efficacious, but still significantly exceeded efficacy of mean therapeutic dose of DF.

Secondary immunologic reaction started to form on the sixth day (mean left paw volume increase was $17\pm 2\%$). On the 25th day it reached $42\pm 5\%$ in control and vehicle group. Treatment with LA dosed 1/10 and 1/200 DL50 almost deleted adjuvant-induced secondary im-

munologic reaction. LA dosed 1/100 DL50 was not that effective, but exceeded DF efficacy again.

LA administration down-regulated the increased paw temperature, which was registered by IR-thermography. Blood test showed normalization of white blood cells, increased monocytes were brought to norm as well.

Conclusion. Thus, we showed for the first time, that oral administration of LA dramatically diminishes primary inflammatory and secondary immune reaction and exceeds efficacy of DF on the model of adjuvant-induced arthritis.

Discussion. Potential efficacy of LA in treatment of AA may be explained by a number of reasons.

Free-radical inflammation is known to serve as a base of any inflammation. LA as a substance with potent antioxidant features scavenges free oxygen and nitrogen species and inhibits this mechanism.

Currently, much attention is paid to the role of cytokines in RA pathogenesis. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is known to be that of major importance. It triggers production of proinflammatory cytokines, such as TNF- α itself, Il-1, Il-6, Il-7 and others in hyperplastic synovial fibroblasts, lymphocytes and macrophages. It also stimulates expression of angiopoietin-1 receptors, increases number of osteoclasts. It is now demonstrated on a number of in vitro models, that LA inhibits production of TNF- α . This mechanism is also typical of the most rapidly developing group of anti-rheumatoid drugs – biologic agents.

Destruction of joint tissues is realized by matrix metalloproteinases (MMP). Their production is stimulated by receptor activator nuclear factor κ B ligand (RANKL), which is produced by synovial fibroblasts, T-lymphocytes, macrophages and osteoblasts after their stimulation by Il-1, Il-6, Il-17 and TNF-alpha. LA is known to directly inhibit RANKL and MMP production.

Complement activation plays an important role in pathogenesis of RA and maintains inflammation and tissue destruction. LA inhibits complement activation, regardless to the way of activation (whether it is NO-, lipopolysaccharide- or arachidonic acid metabolites-induced activation)

For these reasons further study of mechanisms of effectiveness of LA as a pathogenetic therapy of rheumatoid arthritis is promising.

**NEURO-IMMUNE COMPONENT OF INFLAMMATION:
FUNCTIONS OF NEUTROPHIL CONTROLLED BY
NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS**

V. G. Safronova¹, E. A. Vulfius¹, E.V. Kryukova², V. I. Tsetlin²

¹ - Institute of Cell Biophysics of Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Russia

² - Shemyakin M.M. & Ovchinnikov Yu.A. Institute of Bioorganic
Chemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
safronova@icb.psn.ru

Conception of cholinergic regulation of inflammation through the efferent arc was suggested last decade. It named “acetylcholine anti-inflammatory pathway”. Activation of the physiological path including vagus nerve releasing acetylcholine (ACh) and homomeric alpha7 nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) on tissue macrophages attenuate production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6 и IL-18) and therefore inhibit inflammation. Nicotine and other exogenous selective agonists act similarly so alpha7 nAChR can be considered as a pharmacological target for inflammatory reactions of different ethiology. Some subtypes of nAChR were characterized on T and B lymphocytes, monocytes, macrophages and dendritic cells. Neutrophils, which main function is to provide quickest and powerful reactions in inflammation, are also supplied with nAChR. Thus alpha7-, alpha4beta2- and alpha3beta4 subtypes of nAChR were revealed in human neutrophils. But functions of different nAChR subtypes in neutrophils remain to be clear.

The aim of our work was to determinate subtype of nAChR in mouse neutrophils and to find the role of these receptors in regulation of neutrophil functioning. We took the agonists of nAChR (ACh, nicotine and epibatidine) and selective antagonists of nAChR subtypes: alpha-cobratoxin (alphaCTX) –alpha7 and muscle type of nAChR; mutant toxin [A10L]PnIA - alpha7 and alpha3beta2; MII - alpha3beta2 and alpha6-containing heteromeric nAChR. Neutrophils isolated from acute inflammatory centre in peritoneal cavity of NMRI, C57BL/6 and Balb/c strains of mice were used.

Our main results: 1) ACh and nicotine modified generation of reactive oxygen species (ROS) initiated with peptide N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) and phorbol ether in time- and concentration-dependent manner, whereas epibatidine did not influence base level of ROS and the respiratory burst activated with fMLF; 2) ACh and nicotine increase nonspecific adhesion of neutrophils depending of time and dose; 3) effect of agonists depended on sex of animals and predominated in the cells of males; alphaCTX, MII and [A10L]PnIA inhibited effects of ACh and nicotine. Data obtained suggest that mouse neutrophils express alpha7 and alpha3beta2 subtypes of nAChR, which involved in regulation of adhesion and generation of ROS in neutrophils from acute inflammatory site.

Supported by RFBR grants №07-04-01004 и №10-04-00737.

IMBALANCE OF THE OXIDATIVE METABOLISM IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS AND THEIR RELATIVES

O.M. Semenova¹, A.E. Khorosheva²

¹ – Republic Clinical Hospital № 3, Kazan, Russia

² - Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Russia
semenova.olga.m@gmail.com

Rheumatoid arthritis (RA) is the lesion of the joints and one of the key mechanisms of RA is the chronic inflammatory process.

Development of RA is divided into two stages. Early rheumatoid arthritis is the stage of gradual inclusion of the disease mechanisms and the development of typical clinical symptoms. Formally, it is the lesion of the joints lasting no longer than 6 months. However, objectively the duration of early arthritis is individually determined (sometimes up to 2-3 years). Advanced rheumatoid arthritis is the disease with all its typical manifestations (the destruction of the joints, appearance of the diagnostic markers of RA, chronic inflammatory process).

Genetic (first-degree) relatives of the patients with rheumatoid arthritis are predisposed to the development of autoimmune pathologies, and before the onset of the disease they have identified clinical

signs of immune system malfunctioning, in particular, the tendency to frequent and prolonged common infections (Arleevskaya et al., 2005).

The goal of our study was to identify clinical signs of oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis and their relatives, compared with a control group of healthy women with no hereditary predisposition to the autoimmune diseases.

The leukocytes of patients with early rheumatoid arthritis are characterized by the excessive spontaneous and opsonized zymosan(OZ)-induced production of the oxygen radicals. Under the stimulation of relatives' leukocytes by OZ production of reactive oxygen species compared with the control group was also increased.

Excess spontaneous production of oxygen radicals by the cells of RA patients could indicate the constant stimulation of leukocytes by pro-inflammatory stimuli in chronic autoimmune inflammation. Increased ROS production in patients with early RA and their relatives under the OZ stimulation probably is due to priming of leukocytes during the frequent and prolonged episodes of infections.

In patients with duration of RA more than 3 years, the level of stimulated ROS production is close to the control level that with the presence of excess levels of priming stimuli apparently indicates the depletion of leukocytes.

The studies of whole blood of RA patients and their relatives did not reveal significant differences in spontaneous and stimulated levels of ROS production compared with the control group. It is known that ROS interact mainly with the components of antioxidant system, as well as lipids and proteins, which are eliminated from the bloodstream by the mononuclear phagocytes.

We observed increased levels of oxidized products in groups of RA patients and their relatives, in spite of the absence of the clinical and laboratory signs of inflammation at the time of blood samples collection.

We suppose that the RA patients and their relatives have a malfunction of mononuclear phagocytes, which leads to the violation of the excretion of oxidized products and their accumulation. The high level of oxidative stress markers and increased the intensity of ROS in relatives and patients with early rheumatoid arthritis, probably due to the frequent and prolonged infections.

LABORATORY MARKERS OF PREDISPOSITION TO THE DEVELOPMENT OF THE ATHEROSCLEROSIS IN SYSTEMIC SCLERODERMA

I. L. Serdyuk¹, Minh Ngo Thi Binh²

¹ – Republic clinical hospital №3, Kazan, Russia

² – Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Russia

dr.serdyuc@mail.ru

Systemic diseases of connective tissues are the actual and acute problem of modern medicine. Systemic scleroderma (systemic sclerosis, SS) has an important place among them according to its frequency and distribution. SS is the autoimmune pathology causing sclerotic degeneration of skin and internals.

Chronic inflammation plays the role in development of the disease. Under the inflammation active infiltration of tissues by the circulating leucocytes is occurred. These cells product reactive oxygen species (ROS), their excesses are utilized by the anti-oxidant system. Oxidative stress develops in the case of imbalance between the oxidants and anti-oxidants. Excesses of the oxide radicals cause oxidative modification and damage of the proteins, lipids and DNA, which in turn enhances inflammation.

Problem of interconnection between the autoimmune diseases and atherosclerosis has been actively studying last years. In the development of atherosclerosis major role is played by the pro-atherogenic factors: chronic inflammation, hypertriglyceridemia, high content of the oxidized lipoproteins, including LDLP and change of ratio of the LDLP and HDLP. Anti-atherogenic effect has an HDLP and anti-oxidant system.

The aim of this study was to find out the laboratory signs of predisposition to the development of the atherosclerosis in SS patients.

We didn't reveal reliable differences in group under the investigation of ROS generation in leucocytes suspension, but it is worth to note that spontaneous and opsonized zymosan-induced ROS production was increased in SS patients (in 2.2 times) as compared with healthy donors. Perhaps, lack of the reliable increase of the oxidese

activity is stipulated by the minimal activity of the chronic inflammation in SS.

Simultaneous registration of the oxidative activity in blood is of interest to estimate integrative function of the antioxidant system. The level of spontaneous and OZ-induced ROS generation in SS patients' blood was reliably increased. Thus, we can suppose that functioning of anti-oxidant systems in SS patients are insufficient since they are not manage even minimal increasing of the oxidative activity.

As is known lipid peroxidation and oxidative modification of proteins is provoke by the oxide radicals. Content of the oxidized products in blood depends on ratio of their synthesis and excretion. We have discovered the reliable increasing of the content of the oxidized proteins and products of the serum lipids peroxidation in SS patients as compared with healthy women.

Excess of ROS in blood stipulates an oxidation of the serum proteins and lipids that provokes development of the autoimmune reactions and atherosclerosis.

We have also revealed other shifts in serum lipids composition of SS patients. The level of triglycerides (TG) exceeds control value in 2.3 times, but this rising was unreliable. The levels of cholesterol and cholesterol of the LDLP were reliably increased as compared with healthy donors. The level of the LPHP cholesterol was reliably decreased in patients. Our data let us to suppose that violations in antioxidant HDLP are occurred in SS.

Shifts in the content of the LPDP and LPHP cholesterol are pro-atherogenic that evidenced by the increasing of atherogenic index (AI) in SS patient in 3 times.

We divided group of SS patient into two subgroups according to AI. In subgroup with AI more than 3 the level of serum lipids peroxidation was reliably higher than healthy group and subgroup of the SS patients with AI lower than 3. Perhaps intensity of the proatherogenic shifts in lipid content in the SS patients depends on the degree of manifestation of the autoimmune inflammation.

Thus, in SS patients proatherogenic shifts in serum lipoproteins cholesterol were revealed.

THE ROLE OF RHO FAMILY SMALL G-PROTEINS IN THE REGULATION OF THE RESPIRATORY BURST OF THE NEUTROPHILS

J.V. Filina^{1,2}, A.G. Gabdoulkhakova²,
V.G. Safronova³, M.A. Nyukhnin²,

¹ – Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Russia

² – Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

³ – Institute of Cell Biophysics, Puschino, Russia

julia.v.filina@gmail.com

N-formylpeptides (fMLP, fMLF) – the products of bacterial and mitochondrial proteins degradation – are the major group of chemoattractants which activate the chemotaxis, secretory degranulation and respiratory burst. Receptors with high and low affinity to formylpeptides can use different ensembles of pathway components for the signal transduction. Experimental evidences are following: the insulin-priming of the fMLF-induced respiratory burst of mice neutrophils occurs only under the stimulation of the cells by the formyl peptide in high concentration (Safronova, Gabdoulkhakova, 2009). Furthermore specific inhibitors of the MEK and MAPK induced reliable suppression of the response to 1mkM fMLF, but not to 50 mkM. ROS generation and granulation under the activation of the low-affinity receptors is selectively blocked by PIP₂-binding peptide PBP10 (Fu et al., 2004). But signaling systems involved in receptor-induced ROS generation under the activation of high- and low-affinity fMLP-receptors (FPRs) are not clear determined.

The number of cell processes including of NADPH-oxidase functioning, phagocytosis, endocytosis, epithelial cells polarization and morphogenesis are regulated by small GTPases (Schwartz, 2004). We supposed small G-proteins to be one of the probable points of FPRs signal transduction and divergence, and aim of this research was to find out the role of Rho family small G-proteins in signaling of high- and low-affinity fMLP-receptors. The study was carried out on induced peritoneal neutrophils of Balb/c mice using the fluorescent microscopy, chemiluminescence and Western blot. Activation of small G-proteins was induced by Rho Activator (CN01, Cytoskeleton) and Rac and Cdc42 Activator (CN02, Cytoskeleton).

Translocation of Rho-GTPases to membrane area has occurred under the stimulation of neutrophil FPRs and evidencing their activation (Michaelson et al., 2001). The prominent effects were observed to Rho under the stimulation of low-affinity FPRs and to Rac under the stimulation of high-affinity receptors.

Rho activation leads to stress fibers formation and focal adhesion (Ren et al., 1999; Schwartz, 2004). In our experiments Rho activator reduced respiratory burst under the stimulation of high-affinity receptors and had no effect on the respiratory burst under the stimulation of low-affinity FPRs. Regulation of NADPH-oxidase activity is probably associated with reciprocal relationships between chemotaxis and respiratory response: the suppression of the ROS generation happens while the movement of the neutrophils towards the gradient of chemotactic molecules.

Rac/Cdc42 activator also induced down-regulation of the respiratory response to low concentrations of fMLF and didn't effect on the respiratory burst triggered by the stimulation of low-affinity FPRs. Rac and Cdc42 mediate the signal transduction from membrane receptors, Rac2 in phagocyte also directly participates in ROS generation as a component of NADPH-oxidase, and Rac and Cdc 42 can regulate cytoskeleton mainly by interaction with Rho.

Regulation of the ROS generation by Rac/Cdc42 can be caused by joint activation of Cdc42 and Rho, but not by Rac and Rho proteins, since their activity is known to be antagonistic (Nobes&Hall, 1995; Rottner et al., 1999) or their actions could be independent.

Cascades of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are the key components of membrane receptors' intracellular signal network. It's known that p38 MAPK can phosphorylate cytoplasmic subunits of NOX (Ammendola et al., 2004). It's also shown that inhibitors of p38 reduce respiratory burst under the stimulation of high-affinity FPRs (Safronova&Gabdoukhakova, 2009).

In our experiments the level of activated p38 MAPK (p-p38) raised under the stimulation of high- and low-affinity FPRs. Activation of small G-proteins differently reacted on the level of p-p38MAPK. Rho activator decreased the level of p-p38MAPK even lower than control value that could be a result of phosphatase activation and initiation of dephosphorylation. Rho obviously does not participate in signal transduction from FPRs to p38MAPK, since treat-

ment by Rho activator and fMLF acts oppositely, and the alteration of p-p38 level reflects the sum of Rho activator and fMLF effects.

In contrast to Rho the activation of Rac/Cdc42 increased the level of double-phosphorylated p38MAPK. Rac/Cdc42 activation promotes p38MAPK phosphorylation in the signaling from low-affinity fMLF receptors and at the same time intercepts p38MAPK phosphorylation in the signaling from high-affinity receptors. So, the regulation of the respiratory response under the stimulation of FPRs can occur through the regulation of p38MAPK phosphorylation with the participation of Rac/Cdc42.

Thus, Rho family small GTPases participate in FPRs signaling and can regulate neutrophils' respiratory burst. Activation of Rho and Rac/Cdc42 proteins has no effect on the ROS production under the stimulation of low-affinity receptors and suppresses the ROS production under the stimulation of high-affinity FPRs. Regulation of the respiratory burst by Rac/Cdc42 proteins under the stimulation of fMLF receptors can occur due to regulation of phosphorylation of p38MAPK.

The project was supported by RFBR № 09-04-97053.

ASSESSMENT OF THE OXIDATIVE STRESS LEVEL IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS ON EARLY AND ADVANCED STAGE OF DISEASE AND THEIR HEALTHY RELATIVES

A.A. Khabibullina¹, M.I. Arleevskaya², T.A. Nevzorova¹

¹ - Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Russia

² – Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

TNevzorova@mail.ru

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease of the connective tissue of joints with involvement of other tissues and organs to the pathological process.

Reactive oxygen species (ROS) may be involved in the development of RA. Change the level of ROS and oxidative stress may be to serve as sign for testing of RA development and the initiation of

pathological processes in relatives of patients who may have genetic predisposition to RA.

Changes that occur during pathological processes in RA patients are accompanied by variation of the oxidative stress depending on the history of the disease.

The content of lipid hydroperoxides is increased ($\alpha = 0,05$) in serum - 0,04 OE / ml and 0,04 OE / ml in relatives and patients with RA on advanced stage of disease respectively.

The activity of erythrocyte superoxide dismutase of relatives is increased (38% inhibition of adrenaline). The activity of catalase of relatives is increased (0,011 micromol / min: 0,0008; 0,075).

No significant differences in the content vitamins A and E in the blood serum between the groups were found. The content of carotenoids in the blood serum of relatives is increased – 3,7 mg / ml (1,25; 6,0).

The content of nitric oxide of relatives is increased ($\alpha = 0,05$) in serum – 0,024 OE of nitrite ion (0,008; 0,041). The content of nitric oxide of patients with RA on advanced stage of disease is reduced (0,016 OE of nitrite ion: 0,011; 0,047).

The content of ceruloplasmine of relatives is increased in serum – 13,125 mg/ml (3,675; 22,575).

The possible reasons of the development of RA are discussed in this report.

FEATURES OF DNA IN RELATIVES OF RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

R.R. Shamsieva¹, M.I. Arleevskaya², T.A. Nevzorova¹

¹ - Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Russia,

² – Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease of the connective tissue of joints with involvement of other tissues and organs to the pathological process.

The one of characteristic features and, possibly, the one of the reasons of RA development is the high level of autoantibodies (AAb) to DNA in the blood of patients. This AAB may interact with cells of an organism, causing their functional disorders. Probably, the changes in the structure of cell DNA and its exposure to immune system can initiate the formation of pathological AAb to DNA.

To find conformational changes in the structure of leukocyte DNA as nucleosome we investigated the fluorescence of ethidium bromide (EB)-DNA and DAPI-DNA complexes. It is significantly increased in relatives of patients with RA.

Further for studies the structure of phenol extraction DNA from mononuclear cells of healthy donors, RA patients and their healthy relatives and assessed the degree of homogeneity. The cell DNA of RA patients and relatives differ by electrophoretic mobility from DNA of healthy donors. The absorption spectrum of EB-DNA interaction of RA patients and healthy donors are similar and differ from spectrum of EB-DNA interaction of relatives. DNA of relatives, probably on the structural features, intermediate between normal DNA and DNA of an organism with an autoimmune disease.

The possible reasons of the development of RA are discussed in this report.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ TNF- α И ЕГО РЕЦЕПТОРОВ КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФАКТОР НАРУШЕНИЯ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ПРИ АУТОИММУННОМ ТИРЕОИДИТЕ

Э.М. Биктагирова, Е. Н. Чухловина, Л.И. Сагтарова, Г.Р. Вагапова, З.И. Абрамова, О.А. Кравцова 3

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ КСИМЕДОНА И ДИМЕФОСФОНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Р.М. Газизов, Е.А. Ацель, Н.И. Бейлина, Л.Р. Газизова 5

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА С ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ КСИМЕДОНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА ПОСЛЕ ПЕРВОНАЧАЛЬНОГО И ПОВТОРНОГО КУРСОВ ЛЕЧЕНИЯ

Р.М. Газизов, Е.А. Ацель, Н.И. Бейлина, Л.Р. Газизова 8

КОНСТРУИРОВАНИЕ КОНЪЮГАТОВ АНТИТЕЛ К ДНК С ЗОЛОТЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ И ОЦЕНКА ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Э.И. Галямутдинова, Т.А. Невзорова 10

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ АЛЬФА ИНТЕРФЕРОНА НА КИСЛОРОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ГЕПАТИТОМ С (EX-VIVO)

Н.О. Зинкевич, Ю.М. Созинова, С.В. Ткачёва, И.М. Сайфуллин 11

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЕСТЕСТВЕННЫХ АУТОАНТИТЕЛ К ПОЧЕЧНЫМ АНТИГЕНАМ У ДЕТЕЙ

С.В. Мальцев, Г.Ш. Мансурова 13

ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ОБОСНОВАННЫЙ ПОДХОД К ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЦЕРВИЦИТА И ВПЧ-ИНФЕКЦИИ

Л.И. Мальцева, Л.Н. Фаррахова 15

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ОНКОМАРКЕРА P16 ink4 α НА ОСНОВЕ ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ РАННИХ ФОРМ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМ ЦЕРВИЦИТОМ И ВПЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Л.И. Мальцева, Л.Н.Фаррахова.....	17
ТЕРАПИЯ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫХ ХРОНИЧЕСКИХ ЭКЗО-И ЭНДОЦЕРВИЦИТОВ У ЖЕНЩИН	
Л.И. Мальцева, Л.Н. Фаррахова.....	19
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ (eNOS) И РАЗВИТИЕ ГЕСТОЗА У ПЕРВОРОДЯЩИХ ЖЕНЩИН	
Л.И. Мальцева, Т.В. Павлова.....	20
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ГЕСТОЗУ У ПЕРВОРОДЯЩИХ ЖЕНЩИН	
Л.И. Мальцева, Т.В. Павлова.....	22
ПОЛИМОРФИЗМ МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ И ДЕФИЦИТ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ КАК ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ГЕСТОЗА У ПЕРВОРОДЯЩИХ ЖЕНЩИН	
Л.И. Мальцева, Т.В. Павлова.....	26
РОЛЬ ЦИКЛИНА A1 В ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ И КЛЕТКАХ-ПРЕДШЕСТВЕННИКАХ	
Р. Р. Мифтахова, А. Хедблом, А. Бредберг, Дж. Л. Перссон	29
ГИПОМЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ У БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ	
Р.Х. Мухаметшина, Ю.В. Филина, М.И. Арлеевская, А.Г. Габдулхакова	30
РОЛЬ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ В РАЗВИТИИ РЕСПИРАТОРНОГО ОТВЕТА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ	
Тхи Нга Нгуен, Ю.В. Филина, М.И. Арлеевская, А.Г. Габдулхакова.....	33
ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К НАТИВНОЙ ДНК НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА	
А.З. Сабирзянова, Т.А. Невзорова	35
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТА И ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ В ЛЕЧЕНИИ АДЪЮВАНТНОГО АРТРИТА КРЫС	
Сабирова А.Я., Залялютдинова Л.Н., Насыбуллина Д.А., Петрова А.А.	36
НЕЙРО-ИММУННЫЙ КОМПОНЕНТ ВОСПАЛЕНИЯ: ФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛА ПОД КОНТРОЛЕМ НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ АЦЕТИЛХОЛИНА	
В.Г. Сафронова, Е.А. Вульфийус, Е.В. Крюкова, В.И. Цетлин.....	39

ДИСБАЛАНС ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И ИХ РОДСТВЕННИКОВ

О.М. Семенова, А.Е. Хорошева 41

ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАЗВИТИЮ АТЕРОСКЛЕРОЗА ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

И.Л.Сердюк, Нго Тхи Бинь Минь 43

РОЛЬ МАЛЫХ G-БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА RHO В РЕГУЛЯЦИИ РЕСПИРАТОРНОГО ОТВЕТА НЕЙТРОФИЛОВ

Ю.В. Филина, А.Г. Габдулхакова, В.Г. Сафронова, М.А. Нюхнин 45

ОЦЕНКА УРОВНЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ НА РАННЕЙ И ПОЗДНЕЙ СТАДИЯХ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ИХ ЗДОРОВЫХ РОДСТВЕННИКОВ

А.А. Хабибуллина, М.И. Арлеевская, Т.А. Невзорова 48

ОСОБЕННОСТИ ДНК РОДСТВЕННИКОВ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Р.Р. Шамсиева, М.И. Арлеевская, Т.А. Невзорова 49

ENGLISH 51

TNF- α AND ITS RECEPTORS GENES POLYMORPHISMS AS A FACTOR OF THE GENETIC DISORDERS PROGRAMMED CELL DEATH IN AUTOIMMUNE THYROIDITIS

Е.М. Biktagirova, E.N. Chukhlovina, L.I. Sattarova, G.R. Vagapova, Z.I. Abramova, O.A. Kravtsova 51

COMPARATIVE EFFICACY OF DRUGS WITH IMMUNOMODULATING ACTIVITY XYMEDON AND DIMERPHOSPHON IN CHRONIC RHEUMATIC HEART DISEASE

R.M. Gazizov, E.A. Aczel, N.I. Beilina, L.R. Gazizova 53

LONG-TERM RESULTS OF THE USE OF DRUGS WITH IMMUNOMODULATING ACTIVITY XYMEDON IN CHRONIC RHEUMATIC HEART DISEASE AFTER INITIAL AND RE-TREATMENT

R.M. Gazizov, E.A. Aczel, N.I. Beilina, L.R. Gazizova 56

CONSTRUCTION OF CONJUGATES ANTIBODIES TO DNA WITH GOLD NANOPARTICLES AND EVALUATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

E.I. Galyamutdinova, T.A. Nevzorova.....	57
INFLUENCE OF PREPARATIONS AN ALPHA-INTERFERONS ON OXYGEN METABOLISM OF NEUTROPHILS OF A PERIPHERIC BLOOD PATIENTS OF A HEPATITIS C (EX-VIVO)	
N.O. Zinkevich, J.M. Sozinova, S.V. Tkachyova, I.M. Sayfullin.....	58
PREDICTIVE SIGNIFICANCE OF INVESTIGATION OF NATURAL ANTIBODIES AGAINST RENAL ANTIGENS IN CHILDREN	
S.V. Maltsev, G.Sh. Mansurova.....	60
PATHOGENETICALLY PROVED DIFFERENTIATIVE THERAPY OF CHRONIC CERVITITES AND HPV IN WOMEN	
L.I. Maltseva, L.N. Farrahova.....	61
IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF THE EXPRESSION P16ink4α BASED ON LIQUID CYTOLOGY IN THE DIAGNOSIS OF EARLY FORMS OF CERVICAL CANCER IN WOMEN WITH CHRONIC CERVITITIS AND HPV-INFECTION	
L.I. Maltseva, L.N. Farrahova.....	63
THERAPY OF HPV-ASSOCIATED CHRONIC CERVITITIS IN WOMEN	
L.I. Maltseva, L.N. Farrahova.....	64
POLYMORPHISM OF THE ENDOTHELIUM NO-SYNTASE GENE IN THE CASE OF THE PREECLAMPSIA DEVELOPMENT IN THE PRIMIPARA WOMEN	
L.I. Maltseva, T.V. Pavlova.....	64
GENETIC PREDISPOSION TO THE PREECLAMPSIA IN PRIMIPARA WOMEN	
L.I. Maltseva, T.V. Pavlova.....	67
POLYMORPHISM OF METHYLENTETRAHYDROFOLAT-REDUCTASE AND FOLIC ACID DEFICIENCY AS RISK FACTORS OF THE DEVELOPMENT OF PREECLAMPSIA IN PRIMIPARA WOMEN	
L.I. Maltseva, T.V. Pavlova.....	70
THE ROLE OF CYCLIN A1 IN HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELLS	
R. Miftakhova, A.Hedblom, A. Bredberg, J. L.Persson.....	73
HYPOMETHYLATION OF MONONUCLEAR BLOOD CELLS' DNA OF THE PATIENTS WITH AUTOIMMUNE DISEASES	
R.Kh. Mukhametshina, J.V. Filina, M.I.Arleevskaya, A.G. Gabdoulkhakova	74

**ROLE OF EXTRACELLULAR CALCIUM IN LEUKOCYTE
RESPIRATORY BURST IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE
DISEASES**

Thi Nga Nguen, J.V. Filina, M.I. Arleevskaya, A.G. Gabdoulkhakova 76

**EFFECT OF IGG-ANTIBODIES TO DOUBLE-STRANDED DNA ON
HUMAN IMMUNOCOMPETENT CELLS**

A.Z. Sabirzanova, T.A. Nevzorova 78

**EFFICACY OF ANTIOXIDANT AND DICLOFENAC SODIUM IN
TREATMENT OF RAT ADJUVANT ARTHRITIS**

Sabirova A. Ya., Zalyalyutdinova L.N., Nasybullina D.A., Petrova A.A. 79

**NEURO-IMMUNE COMPONENT OF INFLAMMATION:
FUNCTIONS OF NEUTROPHIL CONTROLLED BY NICOTINIC
ACETYLCHOLINE RECEPTORS**

V. G. Safronova, E. A. Vulfius, E.V. Kryukova, V. I. Tsetlin 82

**IMBALANCE OF THE OXIDATIVE METABOLISM IN
RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS AND THEIR RELATIVES**

O.M. Semenova, A.E. Khorosheva 83

**LABORATORY MARKERS OF PREDISPOSITION TO THE
DEVELOPMENT OF THE ATHEROSCLEROSIS IN SYSTEMIC
SCLERODERMA**

I. L. Serdyuk, Minh Ngo Thi Binh 85

**THE ROLE OF RHO FAMILY SMALL G-PROTEINS IN THE
REGULATION OF THE RESPIRATORY BURST OF THE
NEUTROPHILS**

J.V. Filina, A.G. Gabdoulkhakova, V.G. Safronova, M.A. Nyukhnin 87

**ASSESSMENT OF THE OXIDATIVE STRESS LEVEL IN PATIENTS
WITH RHEUMATOID ARTHRITIS ON EARLY AND ADVANCED
STAGE OF DISEASE AND THEIR HEALTHY RELATIVES**

A.A. Khabibullina, M.I. Arleevskaya, T.A. Nevzorova 89

**FEATURES OF DNA IN RELATIVES OF RHEUMATOID ARTHRITIS
PATIENTS** 90

R.R. Shamsieva, M.I. Arleevskaya, T.A. Nevzorova 90

**МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ
МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ**

**THE INTERNATIONAL MEETING “NEW CONCEPTS ON THE
MECHANISMS OF INFLAMMATION, AUTOIMMUNITY AND
TUMOROGENESIS”
CONFERENCE MATERIALS**

Все материалы опубликованы в авторской редакции
All materials are published in author's edition

ISBN 978-5-9716-0055-8



Подписано в печать 10.07.2011г.
Формат 60x84¹/₁₆. Печатных листов 6,25.
Бумага офсетная, тираж 300. Заказ Н-29.

Отпечатано в



г. Казань, ул. Муштари, 11, тел. 296-61-58.

E-mail: meddok2005@mail.ru