

Выводы

1. Однократное воздействие характеристического ионизирующего излучения Mo 30 кв в течение 2 часов и облучение в терапевтических дозах 50, 70, 90 Грей *in vitro* на стандартизованные образцы дентина зуба не приводят к видимым в световой микроскоп при увеличении $\times 500$ изменениям структуры.
2. Устойчивость к деформации на сжатие образцов дентина после характеристического ионизирующего облучения снижается в 2 раза по сравнению с не облученным.
3. Определено незначительное снижение устойчивости дентина к деформации под влиянием нагрузки, коррелирующее с дозой облучения напрямую.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев Ю.И. Лучевая терапия злокачественных опухолей челюстно-лицевой области и стоматологические проблемы [Текст] / Ю.И. Воробьев // Российский стоматологический журнал. – 2006. - №5. – С. 24-29.
2. Açıllı Y. Proof of direct radiogenic destruction of collagen *in vitro*. [Text] / Açıllı Y, Springer IN, Niehoff P, Gassling V, Warnke PH, Açıllı S, Sönmez TT, Kimmig B, Lefteris V, Wiltfang J. // Strahlenther Onkol. – 2007. -183(7). – P. 374-379.
3. Bebesheko V. H. The state of the dental hard tissues in persons under the influence of ionizing radiation (based on the data from infrared spectroscopy [Text] / V. H. Bebesheko, L. O. Darchuk, L. V. Zaverbna // Lik Sprava. - 2000 - № 3-4 – P. 21-5.
5. Kielbassa A. M. Effect of demineralization and remineralization on microhardness of irradiated dentin.[Text] / A.M. Kielbassa, I. Munz, G. Bruggmoser, J. Schulte-Mönting // J Clin Dent. – 2002. - 13(3). – P.104-110.
6. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature[Text] / J.H. Kinney, S.J. Marshall, G.W. Marshall //Crit. Rev. Oral. Biol. Med. -2003, vol. 14, №1, pp. 13-29

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ СЕЛЕНА НА МОДЕЛИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Буханцев В.А., Довженко Е.И., Минин В.В., Ошурков П.А.

Научный руководитель – д.м.н., профессор Макеев О.Г.

ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Росздрава,

ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий.

Селен представляет собой физиологически важный микроэлемент, незаменимый в питании человека и животных. Основные пути метаболизма селена в организме расшифрованы [2]. Основной биологической ролью селена у эукариот, по современным данным, является его участие в синтезе и активности глутатионпероксидазы I, II III и IV, селензависимой пероксидазы нейтрофилов, белков семейств селенопротеинов Р и W, 5'-йодотирониндейодиназ I, II и III, тиоредоксинредуктазы, а также, возможно, функции простетической группы в селенсвязывающих белках [4]. Полученный клинический и экспериментальный материал свидетельствует о тесной связи дефицита селена с усилением опасности определенных вирусных инфекций, в частности, с возникновением новых модификаций вирулентных вирусов [1], что определяет актуальность данного исследования.

Цель исследования – оценить влияние различных форм препаратов селена на иммунную систему и генетический аппарат на модели птицы.

Материалы и методы исследования

В качестве модели для исследования были выбраны цыплята-бройлеры Среднеуральской птицефабрики. Исследовали различные препараты селена – селенометионин, селенит натрия и комбинированная форма препаратов, которые добавляли в рацион питания цыплят-бройлеров. Исследуемые особи (n=20) были разделены на четыре равные группы – контрольную (группа 1), с применением селенита натрия (2), селенометионина (3), комбинации препаратов (4). Подкормку проводили с момента вылупления и далее – в течение 7 дней – до забоя. Материалом для исследования служили лимфоциты цыплят, полученные из селезенки.

Степень иммунного ответа оценивали по синтетической активности клеток в стимулированной культуре лимфоцитов. Лимфоциты культивировали в смеси, содержащей среду RPMI 1640 с пенициллин-стрептомициновой смесью, митоген (конканавалин А) и раствор меченого [^{14}C]-тимидина. Отбор проб производился через каждые 6 часов, начиная с 12 часов от начала культивирования в течение 2,5 суток. Пробы отмывали от невключившегося меченого тимидина посредством четырехкратной промывки на холоде дистиллированной водой с последующим переосаждением макромолекул центрифугированием при 2,5 кгрт в течение 15 мин. Пробы высушивали, перерастворяли в спирте и вносили в сцинтилляционные флаконы, содержащие спирто-толуоловый сцинтиллятор (соотношение спирт/сцинтиллятор – 1:5). Регистрацию включившейся радиоактивности производили на автоматическом жидкостном сцинтилляционном счетчике «Бета-2». Результаты выражали в Беккерелях (Бк) на 10^6 клеток.

Степень повреждения генетического аппарата клеток определяли методом анализа полиморфизма длин случайно амплифицированных фрагментов ДНК (RAPD-анализ). Методика подробно описана в ранее опубликованном исследовании [3]. Для проведения RAPD-анализа образцы ткани селезенки подвергались гомогенизации. Из полученных проб методом фенольной депротенизации с использованием протеиназы К выделяли ДНК. Объем полученной ДНК составлял 30 мкл для каждой пробы. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по стандартной методике. Для постановки реакции использовали специфические праймеры и нуклеотиды (dCTP, dATP, метил-dTTP), меченые тритием. Полученный амплификат разделяли в процессе горизонтального агарозного гель-электрофореза в ТАЕ-буфере при 100 В в течении 15 мин.

По окончании электрофореза гелевые пластины делили на дорожки. Полученные фрагменты геля помещали во флаконы, из которых путем температурной экстракции (80°C в течении 2 часов) в абсолютном изопропанолe извлекали амплифицированные фрагменты ДНК. Фрагменты геля помещали во флаконы и подсчитывали радиоактивность в толуоловом сцинтилляторе на сцинтиляционном счетчике «Бета-2». Результаты выражали в Бк на мкг ДНК.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ MS Excel, STATISTICA.

Результаты исследования и обсуждение

Результаты исследования радиоактивности образцов, стимулированных культур лимфоцитов, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Включение ¹⁴C-тимидина в ДНК лимфоцитов цыплят-бройлеров при стимуляции митогеном в различные сроки культивирования (в Бк/10⁶)

Время культивации, час.	Исследуемые группы			
	Контроль	Неорганический селен	Органический селен	Комбинация селена
12	281,5±46,5	385,8±53,8*	537,9±69,1*	829,8±84,6*
18	651,7±75,4	518,8±62,5	1900,2±215,0*	2177,5±245,2*
24	878,5±87,7	841,8±85,0	1746,3±198,3*	2869,9±268,9*
30	970,8±95,6	1285,9±102,6*	2528,6±243,4*	3464,6±288,8*
36	1401,6±115,2	1337,7±111,8	4188,1±352,4*	4803,3±379,8*
42	1729,2±187,6	1563,4±142,8	3861,8±305,2*	6828,3±587,0*
48	1655,2±164,5	4565,9±365,5*	3679,3±293,9*	2466,5±238,8*
54	2150,0±244,6	4300,0±364,2*	2250,0±253,1*	2695,0±249,6*
60	2610,1±253,4	4056,3±329,8*	1103,9±98,4*	2925,1±265,6*

* - достоверность отличия от контрольной группы $p \leq 0,05$

Во всех исследуемых группах наблюдается нарастание синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови в течение 60-ти часов культивирования, что проявляется в виде увеличения включения ¹⁴C-тимидина в ДНК лимфоцитов.

В контрольной группе увеличение синтеза ДНК имеет линейный характер, во всех остальных случаях наблюдается нелинейное увеличение синтетической активности.

Во второй группе максимальное увеличение синтеза ДНК, в отличие от контрольной группы, происходило к 48 часу, превышая контрольное значение в 2,8 раза; в третьей группе – к 36 часу, превышая контрольное значение в 3 раза, и аналогичное значение второй группы в 3,1 раза в соответствующий срок. В четвертой группе показатель достигает максимального значения к 42 часу и превышает уровень во всех группах (отличие от контрольной группы – в 4 раза, от 2 группы – в 4,4 раза, от 3 группы – в 1,8 раз).

Выявленные отличия исследуемых групп от контрольного уровня можно объяснить не только иммуностимулирующим эффектом препаратов селена, но и параллельным истощением культуральной среды, вследствие активации препаратами селена метаболических процессов.

Таким образом, введение в рацион цыплят бройлеров препаратов селена в условиях стимулированной культуры сопровождается наиболее ранним и выраженным ответом лимфоцитов на антигенную стимуляцию.

Для оценки генетических эффектов препаратов селена использовался метод RAPD-анализа. В зависимости от степени фрагментации, ДНК по-разному распределяется между основной массой неповрежденной и остаточной фрагментированной ДНК, что выражается в разной степени миграции. Степень фрагментации рассчитывалась соотношением количества поврежденной ДНК к сумме тотальной (поврежденной и неповрежденной частей), коэффициенты фрагментации ДНК по исследуемым группам представлены на рисунке 1.

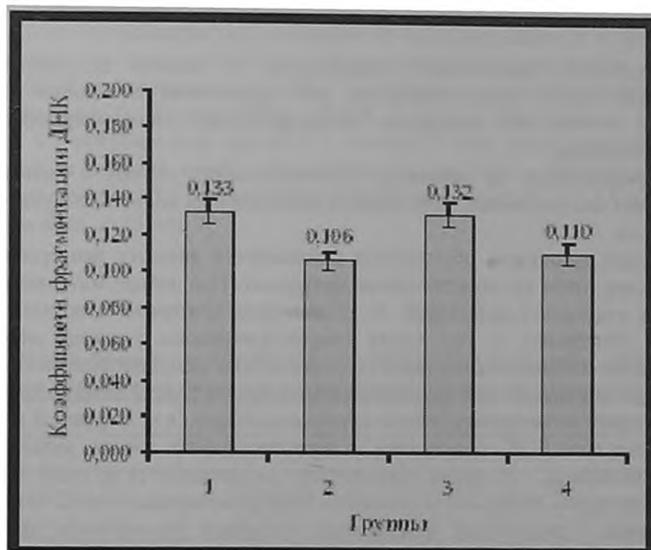


Рис. 1. Коэффициенты фрагментации ДНК в исследуемых группах

Из полученных данных следует, что препарат неорганического селена обладает незначительной генотоксичностью, в пределах допустимой биологической погрешности. При использовании органической формы селена наблюдалось достоверное снижение повреждения ДНК, а в условиях применения комбинации препаратов токсический эффект селенита натрия нивелируется. Эффект увеличения устойчивости генома к действию повреждающих факторов, возможно связан с интенсификацией процессов антиоксидантной защиты, в которых принимают участие соединения селена, что в свою очередь способствует элиминации из организма некоторой части природных химических мутагенов.

Выводы

1. Препараты селена оказывают стимулирующее действие на клетки иммунной системы, что проявляется в усилении синтетических процессов в условиях стимулированной культуры лимфоцитов.
2. Использование препаратов селена повышает резистентность ДНК к повреждающим воздействиям факторов окружающей среды.
3. Наибольшая эффективность среди препаратов селена наблюдается при сочетании органической и неорганической форм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гмошинский И.В., Мазо В.К., Тутельян В.А., Хотимченко С.А. Микроэлемент селен: роль в процессах жизнедеятельности [Текст]// Экология моря. 2004. вып. 54, 5-19 с.
2. Ермаков В.В. Биогеохимия селена и его значение в профилактике эндемических заболеваний человека [Текст]/ Вестник ОНЗ РАН // Электронный научно-информационный журнал. 2004. № 1(22).

3. Кашнельсон Б.А., Makeев О.Г., Дегтярёва Т.Д. Экспериментальное испытание комплекса средств биологической защиты организма от канцерогенного действия комбинации экотоксикантов. [Текст]/ Б.А. Кашнельсон, О.Г. Makeев, Т.Д. Дегтярёва, Л.И. Привалова, В.А. Буханцев, С.А. Денисенко, Т.В. Слышкина, Н.П. Макаренко, И.Х. Измайлов, Е.С. Куликов// Токсикологический вестник. - Москва, №3, 2007. С. 15-20
4. Patching S.G., Gardiner P.H.E. Recent developments in selenium metabolism and chemical speciation: a review [Text]// J. Trace Element Med. Bio. 1999. Vol. 13. P.193-214.

КРИТЕРИИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

Буханцев В.А., Довженко Е.И., Минин В.В., Ошурков П.А.

Научный руководитель – д.м.н., профессор Makeев О.Г.

ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Росздрава

ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Обобщение результатов многолетних исследований в области культивирования постнатальных человеческих клеточных линий, предназначенных для применения в клинике, позволило разработать четырехэтапную схему отбора по критериям включения/исключения, направленную на обеспечение безопасности клеточной терапии.

Схема отбора сформирована на основании анамнестических данных и данных врачебного осмотра, результатов лабораторных исследований, включающих исследования клеточных культур, а также результатов тестового введения клеток.

Одним из ключевых принципов обеспечения безопасности является непрерывность мониторинга. Он осуществляется на каждом этапе по определенным критериям. При заборе материала – отбор пациентов по критериям исключения участников испытаний. К абсолютным критериям относятся острые и хронические заболевания в стадии обострения, в том числе сопровождающиеся тканевой дезорганизацией, а также аутоиммунные заболевания соединительной ткани (коллагенозы) и иммунодефицитные состояния. К критериям исключения относится потенциальная инфицированность возбудителями социально-значимых заболеваний.

Важной составляющей мониторинга является оценка неоплазии в культурах. В наших исследованиях для анализа мутаций используется ДНК, выделенная из культивируемых клеток, культуральной жидкости и, с целью подтверждения неогенеза, – из крови испытуемых. Анализируются мутации в генах p53 кодон 175 (1 мутация), кодон 248 (3 мутации), кодон 273 (4 мутации), B-gal (2 мутации), K-ras (2 мутации) [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Цель исследования – разработка эффективных критериев безопасности применения аутологичных клеточных культур при проведении клинических испытаний.

Материалы и методы исследования

Потенциальную инфицированность возбудителями социально-значимых заболеваний (ВИЧ, вирусные гепатиты В, С, цитомегаловирусная инфекция, туберкулез, токсоплазмоз, инфекции, вызываемые *Chlamydia spp.*) устанавливали иммунофлуоресцентным и иммунополяризационным методами с использованием закрытых систем (AbbotLab) на анализаторе AxSym или с помощью ПЦР-анализа (с применением наборов Flash).

Для анализа использовали ДНК, выделенную из культивируемых клеток, культуральной жидкости и ядродержащих клеток крови доноров.

Кровь отбирали в одноразовые вакуумные полистироловые пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта ЭДТА (Vacutest, Италия), в количестве 9 мл. После чего кровь центрифугировали в мягких условиях при 350g, для сохранения ядродержащих клеток в течение 10 мин при 4°C. На этом этапе использовали рефрижераторную центрифугу MLW K23D (Германия). Далее отбирали ядродержащие клетки с 200-250 мкл плазмы в 1,5 мл полипропиленовую пробирку, не захватывая эритроцитов, и осаждали на центрифуге «MicroSpine» фирмы «Erpendorf» при 8000g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ядродержащих клеток сохраняли до выделения ДНК при -85°C.

Выделение ДНК проводили по методике фенольной депротеинизации. Для чего в культуральную жидкость добавляли 10% SDS в соотношении 1:10 и NaCl до 1M. После перемешивания проводили последовательную экстракцию фенолом, смесью хлороформ-изоамиловый спирт (24/1). Водную фазу переносили в новую пробирку и добавляли в качестве соосадителя раствор гликогена. Содержимое пробирки тщательно перемешивали на Vortex-центрифуге и добавляли 2 объема 96% этилового спирта. Смесь выдерживали в морозильной камере при -25°C в течение 1,5 часов, ДНК осаждали при 13000g в течение 10 мин. Осадок растворяли в деионизованной воде, обработанной DEPC, и сохраняли при -30°C до проведения исследования.

Для выделения ДНК из ядродержащих клеток крови и культивируемых клеток, суспензию предварительно обрабатывали протеиназой К в течение 5 часов, с последующей фенольной депротеинизацией по вышеописанной методике.