

1. Определены различия в степени устойчивости организма лабораторных животных к различным типам гипоксических состояний.

2. Не смотря на то, что при формировании гипоксического состояния различными методиками предполагалось, что конечное состояние функций организма у лабораторных животных должно быть одинаково, были выделены методы, при которых состояния организма лабораторных животных было критическим. Одним из таких является моделирование ишемии головного мозга, при котором погибало до 80% исследуемых животных. Наиболее устойчивыми исследуемые животные оказались к моделированию гипобарической гипоксии, при которой наблюдалась высокая выживаемость.

3. Выделены основные компенсаторные механизмы: усиление легочной вентиляции, учащение сердечной деятельности и увеличение минутного объема крови, ускорение массы циркулирующей крови и диссоциации оксигемоглобина, увеличение в крови количества эритроцитов и гемоглобина, усиление окислительно-восстановительных процессов.

Литература:

1. Асекова К.И. Особенности цитоморфологических показателей эпителиальных клеток у экспериментальных животных при гипоксической нагрузке в барокамере//Международный студенческий научный вестник. – 2018. – № 1.;

2. Литвиций П.Ф./Патофизиология: учебник в 2 т. - 5-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – Т 1. – 422-424 с.

3. Хайбуллина З. Р., Вахидова Н. Т. Состояние периферической крови при острой гипоксии в эксперименте//Медицина: вызовы сегодняшнего дня: материалы Междунар. науч. конф. — Челябинск: Два комсомольца, 2013. — 24-29 с.

4. Хисамова В.А., Ищбульдина К.Р., Габдрахманова И.Д. Ретикулоцитарная реакция крови кроликов в условиях острой барокамерной гипоксии. – ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Уфа. – 2014. – 1-5 с.

5. Министерство здравоохранения Российской Федерации (Минздрав России), Федеральное медико-биологическое агентство (ФМБА России). Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств//Методические рекомендации. ФМБА России МР.21.44-2017. Москва – 2017. - 28-56 с.

УДК 577.24

Десятова М.А., Коротков А.В., Фру М., Макеев О.Г.
**РАЗРАБОТКА ТЕСТ- СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО
ВОЗРАСТА НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА АКТИВНОСТИ ТЕЛОМЕРАЗЫ**

Кафедра медицинской биологии и генетики

Уральский государственный медицинский университет
Лаборатория технологий клеточной и генной терапии
Институт медицинских клеточных технологий
Екатеринбург, Российская Федерация
Университет Рединга, Великобритания

Desyatova M.A., Korotkov A.V., Fry M., Makeev O.G.
**DEVELOPMENT OF A TEST- SYSTEM FOR EVALUATION OF
BIOLOGICAL AGE BASED ON ANALYSIS OF TELOMERASE ACTIVITY**

Department of medical biology and genetics
Ural State Medical University
Laboratory of cellular therapy and gen- technology
Institute of Medical Cell Technologies
Yekaterinburg, Russian Federation
University of Reading, Great Britain

E-mail: mardesyatova@yandex.ru

Аннотация. В данной статье рассмотрен принцип разрабатываемого метода анализа активности теломеразы, предоставляющий возможность использовать оценку ее экспрессии в качестве маркера возраст - зависимого потенциала клеток человека.

Annotation. In this article, the application principle of evaluation of telomerase activity changes had been considered and discussed as a methodic for its possible application as a marker of age- dependent potential of human cells.

Ключевые слова: теломераза, РНК, кДНК, олигонуклеотиды, глиобластома человека, ПЦР, рабдомиосаркома

Key words: telomerase, RNA, cDNA, oligonucleotides, glioblastoma of human, PCR, rhabdomyosarcoma

Введение

В последнее время появилась необходимость поиска надежных маркеров биовозраста человека, в число которых входит и активность теломеразы.

Теломераза представляет собой комплекс РНК и белка, удлиняющий концы хромосом (теломеры), укорачивающиеся при репликации ДНК. Активность теломеразы рассматривается как потенциальный маркер физиологического резерва организма: длительность активного функционирования клетки, а длину теломер - «клеточными часами», ограничивающими число возможных делений клетки [1,3]. Теломераза создает матрицу, по которой достраивает критически короткие теломеры, защищает клетки от сенесенса, позволяет клетке функционировать по сценарию и фенотипу молодой клетки. Основными компонентами теломеразы служат обратная транскриптаза (TERT) , теломеразная РНК и комплекс ассоциированных белков. Все эти компоненты стабилизируют РНК и

способствуют сборке активного фермента. Изменение стабильности и мутации нуклеотидов внутри теломеразных компонентов приводят к снижению активности теломеразы.

В соматических клетках активность теломеразы отсутствует. В то время как в большинстве опухолевых клеточных линиях (80–90 %) теломераза активна, что может быть использовано для создания образцов с высокой активностью теломеразы.

Следует также отметить, что средняя длина теломер варьирует между клетками одной и той же ткани и между отдельными хромосомами, отражая различия репликативной истории (степень клональной экспансии), что не может служить достоверным показателем биовозраста [7]. В связи с этим исследование направлено на определение уровня экспрессии гена теломеразы.

Цель исследования

Целью настоящей работы является разработка тест- системы для оценки биологического возраста на основе анализа активности теломеразы, включающая в себя такие этапы как отработка и подбор клеточных линий, которые будут служить эталонами, а также выбор специфических олигонуклеотидов и отработка режимов для полимеразных цепных реакций под теломеразу.

Материалы и методы исследования

Разработка чувствительной и эффективной тест системы определения активности теломеразы основана на ПЦР амплификации повторов теломер, позволяющей определять теломеразную активность в клетках и тканях человека [5,6,7,8,9, 10].

Культивирование клеток

Исследования были проведены на культурах клеток глиобластомы человека линии A-172 (ATCC CRL 1620), которая была получена из Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия), а также на культурах эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd (ATCC CCL 136) [9], полученной из научно-исследовательского Института вирусных инфекций (г. Екатеринбург, Россия). Клетки культивировали в условиях 95% влажности, 5% CO₂ и температуре 37°C на смеси Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's F-12 (Sigma Aldrich, USA), содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки. Для исследования культуры предварительно высевали во флаконы площадью 25 см² (Orange Scientific, Belgium).

Подсчет клеток проводили с применением ручного прибора для автоматизированного подсчета клеток (Scepter, Millipore).

Подготовка клеточного экстракта

Клетки промывали, используя 1X PBS, осаждали и осторожно удаляли PBS. После удаления PBS клетки аликвотировали в количестве равном 1x 10⁶ клеток на пробирку Eppendorf и хранили при температуре -83° С, так как теломераза в замороженных клетках остается в стабильном состоянии длительное время.

Выделение тотальной РНК и постановка обратной транскрипции

Полученные суспензии смешивали с раствором TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, USA) в соотношении 1:4 и, далее выделяли тотальную РНК согласно инструкции производителя. Сухие осадки РНК растворяли в 10 мкл Rnase free water (Qiagen), измеряли концентрацию, затем проводили реакцию обратной транскрипции в 1 мкг РНК при 37 °С в течение 60 минут с использованием Random гексамеров в 10 мкл смеси (Promega), состоящей из 5X буфера для обратной транскрипции, 10 мМ dNTP, 100 мкМ Random праймера, 5 U MMLV обратной транскриптазы. Для проведения последующих реакций ПЦР использовали 1,5 мкл кДНК в расчете на одну реакцию.

Экспрессию генов теломеразы изучали методом ПЦР. Для детекции уровня активности теломеразы использовали специфические подобранные олигонуклеотидные последовательности гена TERT. Реакции проводили в формате Multiplex с использованием собственно созданного мастер - микса состоящего из ddH₂O 35,5 мкл, 10 х буфера, 2 мкл dNTPs, 50 мМ Mg²⁺, 20 мкМ каждого олигонуклеотида, и 0,3 мкл Taq-полимеразы и 1 мкл полученной ранее кДНК. Амплификацию проводили на приборе программируемом термостате «Терцик» с точным алгоритмом в объеме реакционной смеси равной 53 µl с использованием Lambda- Phage Taq полимеразы. В ходе ПЦР применялся трехэтапный цикл.

Детекцию продуктов амплификации производили методом вертикального акриламидного гель электрофореза (ПААГ) в 10 % геле. В лунки полученного геля помещали 15 µl амплификата. Электрофорез проводили в течение 120 минут при 70 В.

Результаты исследования и их обсуждение

На рисунке приведены результаты анализа ПЦР. Обращает на себя внимание высокая экспрессия гена теломеразы при амплификации кДНК клеточной линии глиобластомы человека (A-172) в образцах 1, 2, 3, где пробы образцов находятся в серийных разведениях, и в положительном контрольном образце (K+). Кроме того, в образцах 2 и 3 прослеживаются «повторные расщепления», представляющие собой дополнительные свечения фрагментов ДНК, свидетельствующие также об интенсивной активности гена теломеразы в опухолевой клеточной линии. Аналогичная картина наблюдалась при амплификации опухолевой клеточной линии рабдомиосаркомы человека.

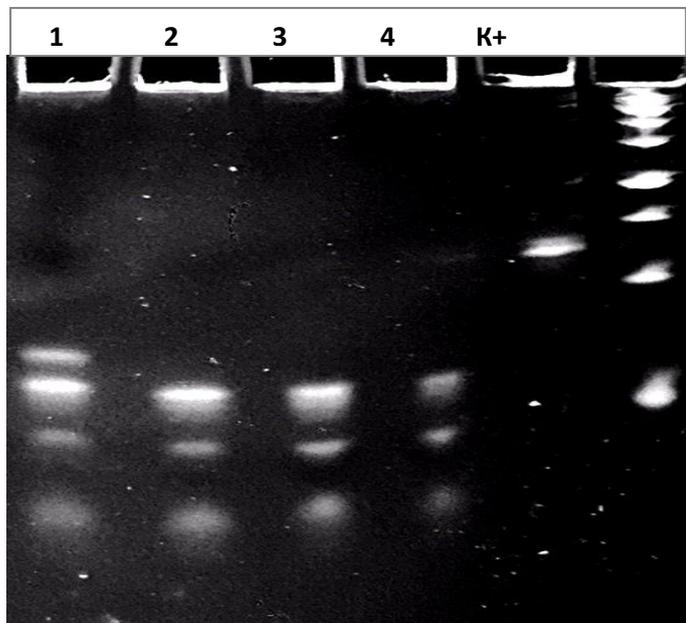


Рисунок 1. Результаты ПААГ электрофореза клеточной линии А- 172.

1- лунка - матрица без разведения; 2- 2х разведение, 3- 4 х разведение; К+- положительный контроль.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что опухолевые клетки выбранных линий, благодаря высокой активности теломеразы, способны к неограниченному делению и поддержанию длины теломер. Если экспрессирующие hTR соматические клетки трансфецировать геном hTERT, то в них, как и в раковых, будет происходить удлинение и стабилизация теломер.

Только один аллель теломеразного гена отвечает за неактивность теломеразного комплекса. Однако, при повреждении гена TERT происходит сборка дисфункционального комплекса, сохраняющего частичную активность или утрачивая каталитическую активность фермента полностью [2].

Клинические и фенотипические проявления при недостаточности теломеразы могут быть различной природы, не будучи причиной патологии, но отражаясь при этом на поддержании гомеостаза.

Выводы:

1. Исследование в области механизмов функционирования теломеразы является перспективным методом и может быть адаптировано под различные типы клеток, основываясь на получении клеточного экстракта с сохранением активности теломеразы и реакции удлинения теломерного субстрата.

2. Полученные опухолевые клеточные образцы при создании тест - набора могут выступать в качестве показателя высокоактивно - экспрессирующей теломеразы.

3. Изучение активности теломеразы может позволить профилактировать

экзогенные факторы риска, повышающие темпы старения и осуществлять подбор теломеразо- активных препаратов.

Список литературы:

1. Blasco M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* – 2005. - Т. 6.- С. 611–6221.
2. Broccoli, D., J.W. Young, and T. de Lange. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA-* 1995.-Т. - 92. - С.9082-9086.
3. Collins K, Mitchell J. R. Telomerase in the human organism. *Oncogene* – 2012. - Т. - 21.- С. 564–579
4. Counter, C.M., H.W. Hirte, S. Bachetti and C.B. Harley. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA-* 2002.-Т. - 91. - С. 2900-2904.
5. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* – 2005.- Т.- 19.- С. 2100–2110.
6. Hastie, N. D., M. Dempster, M.G. Dunlop, A.M. Thompson, D.K. Green and R.C. Allshire. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging. *Nature-* 1995. - Т.- 346. С. 866-868.
7. Hiyama, K., E. Hiyama, S. Ishioka, M. Yamakido, K. Inai, A.F. Gazdar, M.A. Piatyszek, and J.W. Shay. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* - 1995.- Т.- 87.- С. 895-902.
8. Nelson, N.J. Researchers debate clinical role of telomerase. *J. Natl. Cancer Inst.*-2008.Т. - 88. С. 1021-1023.
9. Shay, J.W. and S. Bacchetti. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer.* – 1998. –Т.-33.- С.787-791.
10. Sommerfeld, H.J., A.K. Meeker, M.A. Piatyszek, G.S. Bora, J.W. Shay and D.S. Coffey. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res.* - 1996. – Т. - 37. - С. 218-222.
11. Wright WE, Shay J.W. Telomere biology in aging and cancer. *J Am Geriatr Soc.* – 2006.- Т.- 53.С. 292–294.

УДК 616.31-07

**Зайцева Д.А., Мусальникова Д.А., Лелекова Р.П.
ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РОТОВОЙ
ЖИДКОСТИ В РАЗЛИЧНЫЕ ФАЗЫ ОВАРИАЛЬНО-
МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА**

Кафедра общей химии

Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург, Российская Федерация

Zaitseva D.A., Musalnikova D.A., Lelekova R.P.