

товленной фосфорилирующей смесью при атмосферном давлении, температуре 20–60 °С, в течение 1–14 сут. Структуру, состав и размеры полученных образцов исследовали методами потенциометрического титрования, инфракрасной спектроскопии и ³¹P-спектроскопии ядерного магнитного резонанса, элементного анализа, рентгенофазового анализа, сканирующей электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии.

Результаты. При фосфорилирования в вышеописанных системах были получены фосфаты целлюлозы с содержанием фосфорнокислых групп в интервале 0,2–4,9 ммоль/г, степенью набухания 2,4–119 г/г, относящиеся к классу малотоксичных веществ, способные к гелеобразованию. Результаты исследований показали, что содержание фосфора и степень набухания в значительной степени зависят от продолжительности реакции и температуры процесса. При этом следует отметить, что увеличение температуры и времени реакции способствует накоплению фосфора, в то время как степень набухания проходит через максимум. Так, максимум набухания (112 г/г) фосфатов целлюлозы, полученных при 30 °С, достигается при фосфорилировании в течение 6 сут, а при 40 °С (119 г/г) – за 4 сут.

Заключение. На основании проведенных исследований предложен способ получения биодеструктурируемых полимеров на основе высокозамещенных фосфатов целлюлозы, которые могут быть использованы в качестве носителей противоопухолевых веществ в силу их физико-химических свойств.

С.М. Мирошниченко, А.Н. Дударев, Т.А. Ткаченко, А.Ю. Городецкая, С.И. Давыденко, И.Ф. Усынин

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА СТАУРОСПОРИНА С АПОЛИПОПРОТЕИНОМ А-1 НА КЛЕТочНУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ

ФГБНУ «НИИ биохимии», Новосибирск

Введение. Стауроспорин (СТ) является противоопухолевым препаратом, способным вызывать апоптоз опухолевых клеток с фенотипом лекарственной устойчивости. Однако его использование затруднено в связи с цитотоксичностью по отношению к здоровым клеткам и плохой фармакокинетикой. Создание липосом с более низкими концентрациями СТ позволило снизить его токсичность. Аполипопротеин А-1 (АпоА-1), основной белок липопротеинов высокой плотности (природные переносчики), имеет амфипатические α -спирали, способные связывать плохо растворимые в воде молекулы. Показана его роль в транспорте холестерина, гормонов, жирорастворимых витаминов, ксенобиотиков.

Цель исследования – изучить влияние комплекса СТ с АпоА-1 на удвоение ДНК высокопролиферирующих клеток.

Материалы и методы. Липопротеины выделяли из плазмы крови человека методом изоплотностного ультрацентрифугирования в растворе КВг. АпоА-1 экстрагировали смесью бутанола с диизопропиловым эфиром с последующим высаливанием сульфатом аммония. Чистоту АпоА-1 оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Пролиферацию клеток оценивали по включению [³H]-тимидина («Изотоп», Россия) в ДНК. Для этого за 2 ч до окончания эксперимента в культуральную среду вноси-

ли 2,0 мкКю/мл. Радиоактивность проб измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Mark-III (США). Скорость биосинтеза ДНК рассчитывали в импульсах в 1 мин на 10⁶ клеток. Клетки линии ТНР-1 и мышинной меланомы В16-F10 культивировали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) в присутствии СТ или комплекса СТ с АпоА-1 в течение 4 ч, концентрация СТ (Sigma) изменялась от 0,5 до 0,005 мкМ.

Результаты. Анализ тушения флуоресценции триптофана в АпоА-1 под влиянием СТ указывает на связывание данного индуктора апоптоза с белком. Полученный комплекс был стабилен в течение исследуемого периода (1 мес) и сохранял способность ингибировать включение [³H]-тимидина в ДНК клеток линии ТНР-1 при меньшей концентрации антибиотика в комплексе с АпоА-1. Комплекс усиливал СТ-индуцированный апоптоз клеток линии ТНР-1. Для исследования включения [³H]-тимидина в ДНК (S-фаза) клеток меланомы В16-F10 использовали СТ в концентрации от не влияющей на данный показатель (0,05 мкМ) до ингибирующей на 70 % (0,5 мкМ). В комплексе с АпоА-1 в первом случае ингибирование составило 41 % от контрольного уровня. Повышение концентрации СТ до 0,1 мкМ в среде культивирования снижало включение [³H]-тимидина на 38 %, комплекс усиливал ингибирующий эффект до 56 %. В дальнейшем СТ в комплексе с АпоА-1 снижал включение [³H]-тимидина в ДНК клеток в большей степени, чем СТ сам по себе.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования АпоА-1 для доставки СТ в высокопролиферирующие клетки.

В.А. Мисюрин¹, А.В. Мисюрин¹, Н.А. Лыжко¹, Т.В. Ахлынина¹, Ю.П. Финашутина¹, Л.А. Кесаева¹, А.В. Пономарёв¹, А.Е. Мисюрина², А.А. Крутов², Е.Н. Пушкова¹, О.С. Бурова¹, А.С. Уварова¹, М.А. Барышникова¹

БЕЛОК PRAME СПОСОБЕН ВЛИЯТЬ НА ЭКСПРЕССИЮ СОБСТВЕННОГО ГЕНА

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБУ ГНЦ Минздрава России, Москва

Введение. Экспрессия гена *PRAME* при онкологических заболеваниях наблюдается очень часто. Активность белка *PRAME* оказывает негативное влияние на прогноз. Известно, что *PRAME* способен связываться с бактериальными липополисахаридами и пептидогликанами (PAMPs). Данный белок состоит из лейцин-богатых повторов и имеет структуру, сходную с TLR2 (толл-подобный рецептор 2) и белком RI (ингибитор рибонуклеаз). Известно, что TLR2 через NF- κ B активирует экспрессию гена *TLR2*. Согласно современным представлениям, экспрессия гена *PRAME* запускается при связывании неизвестного поверхностного рецептора с PAMPs. Мы располагаем данными, доказывающими наличие белка *PRAME* на поверхности клетки. Мы предполагаем, что мембраносвязанный белок *PRAME* связывается с PAMPs и передает сигнал внутрь клетки, что приводит к активации экспрессии многих генов, в том числе и гена *PRAME*. Кроме того, *PRAME*, подобно белку RI, может обладать способностью защищать РНК от тепловой деградации.

Цель исследования — доказать способность белка PRAME регулировать экспрессию гена *PRAME*.

Материалы и методы. Выравнивание последовательностей аминокислотных остатков проводилось в программе Vector NTI 10.0. Инкубировали 1 мкг тотальной РНК здорового донора в присутствии 0,1 мкг PRAME и 0,1 мкг RI в течение 12 ч при 37 °С, после оценивали целостность при проведении электрофореза. Клеточные линии ТНР-1 и NОМО-1 инкубировали с анти-PRAME моноклональными антителами (АТ) и PAMPs, использованными в качестве лигандов, в течение 3 сут. Количество белка PRAME внутри клеток, обработанных сапонином, и на внешней мембране клеток, не обработанных сапонином, определяли методом проточной цитофлуориметрии на цитометре FACSCanto II.

Результаты. PRAME и TLR2 имеют 24,6 % аналогичных аминокислотных остатков, а PRAME и RI — 25,8 %. Произошла полная деградация мРНК в отсутствие PRAME и RI, в то время как с этими белками мРНК не разрушалась. В линии ТНР-1 через 1 и 3 дня инкубирования с АТ уровень экспрессии *PRAME* составил 150 и 50 %; с PAMPs — 81 и 57 % соответственно. Через 3 дня инкубирования с АТ и PAMPs количество клеток с белком PRAME на мембране составило 50 и 170 %, а с белком PRAME в цитоплазме — 1085 и 732 % соответственно. В линии NОМО-1 уровень экспрессии мРНК гена *PRAME* после 1 и 4 ч, 1, 2 и 3 дней инкубирования с АТ составил 90, 147, 7, 119 и 95 %; с PAMPs — соответственно 104, 239, 16, 125 и 113 %. Количество клеток с белком PRAME в цитоплазме через 1 и 4 ч, 1, 2 и 3 дня инкубирования с АТ составило 187, 58, 26, 32 и 88 %; с белком PRAME на мембране — 76, 66, 110, 1067 и 222 % соответственно; после инкубирования с PAMPs количество клеток с PRAME в цитоплазме составило 127, 185, 102, 40 и 240 %; с PRAME на мембране — 97, 87, 173, 617 и 166 % соответственно.

Заключение. PRAME, так же как и RI, способен защищать РНК от деградации. Более того, PRAME проявил способность модулировать экспрессию собственного гена и белка, как это характерно для TLR2.

*Н.А. Михеева*¹, *М.А. Семенова*¹, *Г.С. Терентюк*^{1,2},
*В.А. Михеев*³, *Е.П. Дрождина*¹, *Н.А. Курносова*¹

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СИНХРОНИЗИРОВАННЫХ РАКОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ВВЕДЕНИИ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ *IN VITRO*

¹ФГБОУ ВПО УлГУ, Ульяновск;

²ФГБОУ ВПО «СГУ им. Н.Г. Чернышевского», Саратов;

³ФГБОУ ВПО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова», Ульяновск

Введение. Наномедицина и нанофармация разрабатывают механизмы доставки лекарственных веществ, новые методы и средства лечения, методы *in vivo* и *in vitro* диагностики. Ведущей областью применения этих разработок является онкология. Особое место среди наноразмерных материалов занимают золотые наночастицы (ЗНЧ). Оценка клеточных эффектов является особенно важной вследствие наноразмерности действующих агентов, которые непосредственно воздействуют на клеточные структуры. В то же время показатели функционального состояния митохондрий, отражающие адекватность энергопродукции

для поддержания нормального метаболизма клеток, и интенсивность генерации активных форм кислорода (АФК) как показатель выраженности патологических процессов в клетке остаются неизученными.

Цель исследования — изучить влияние ЗНЧ на некоторые метаболические изменения синхронизированных по периодам клеточного цикла клеток *in vitro*.

Материалы и методы. Использована клеточная линия карциномы толстого кишечника НСТ-116. Синхронизацию клеток проводили с помощью двойного тимидинового блока. В культуру клеток вносили 3,125 мкл 10 нМ ЗНЧ (концентрация 0,5 г/л) с добавлением 0,5 мл среды. Митохондриальный потенциал клеток НСТ-116 определяли с использованием флуоресцентного красителя ТМРЕ. Концентрацию АФК определяли с использованием флуоресцентного красителя DCFH-DA. Флуоресценцию изучали в клетках контрольной группы и после 30- и 60-минутной инкубации с ЗНЧ.

Результаты. Инкубация клеток НСТ-116 с ЗНЧ длительностью 30 и 60 мин не сопровождается значительными метаболическими изменениями митохондрий, о чем свидетельствует отсутствие достоверных различий в показателях флуоресценции зонда ТМРЕ в периоды М, G1 и S. Период G2 через 30 мин инкубации с ЗНЧ характеризуется достоверным увеличением митохондриального потенциала, который затем (через 60 мин) уменьшается. Клеточный цикл НСТ-116 при 30-минутном нахождении ЗНЧ в культуре характеризуется достоверным снижением флуоресценции зонда DCFH-DA. Период G2 клеток с ЗНЧ характеризуется меньшим значением флуоресценции по сравнению с клетками контрольной группы. Часовая культивация раковых клеток НСТ-116 с ЗНЧ приводит к 3-кратному снижению продукции АФК в этих клетках в периоды G1, S и G2, М-период клеток через 30 и 60 мин инкубации с ЗНЧ отличается более высокой концентрацией АФК по сравнению с клетками контрольной группы.

Заключение. ЗНЧ в культуре раковых клеток в течение 1 ч не обуславливает развитие оксидативного стресса клеток и не приводит к функциональным нарушениям митохондрий, рост концентрации АФК в М-период в клетках с ЗНЧ будет индуцировать апоптоз раковых клеток, препятствуя их делению.

*Д.В. Мищенко*¹, *М.Е. Неганова*², *Е.Н. Климанова*¹,
*Т.Н. Сашенкова*¹, *У.Ю. Аллаярлова*¹,
*П.А. Тараканов*², *И.В. Высторон*¹

ХЕМОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ СПИРОЦИКЛИЧЕСКИХ ГИДРОКСАМОВЫХ КИСЛОТ ПРИ КОМБИНИРОВАННОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ ЛИМФОЛЕЙКОЗА Р388

¹ФГБУН ИПХФ РАН, Черноголовка, Московская область;

²ФГБУН ИФВ РАН, Черноголовка, Московская область

Введение. Одним из способов повышения эффективности и снижения токсичности известных цитостатиков может стать использование циклических гидроксамовых кислот (ЦГК) в комбинированной химиотерапии. В данном случае возможно использование известных, но весьма токсичных цитостатиков (цисплатин, циклофосфан) в ми-