Н.Г. Преснухина[1], В.И. Першин[1,2*], Н.С. Максимова[1], О.М. Широкова[1], О.Г. Заборская[1,2], Т.Ф. Ковалева[1], И.А. Медяник[1], И.В. Мухина[1,2]

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ ИЗ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ГЛИОМЫ ЧЕЛОВЕКА

[1] Приволжский исследовательский медицинский университет, Н. Новгород, Россия
[2] Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, Россия

N.G. Presnukhina[1], V.I. Pershin[1,2*], N.S. Maksimova[1], O.M. Shirokova[1], O.G. Zaborskay[1,2], T.F. Kovaleva[1], I.A. Medynik[1], I.V. Mukhina[1,2]

COMPARISON METHODS FOR EXOSOME ISOLATION FROM PRIMARY HUMAN GLIOMA CULTURES

[1] Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia
[2] Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

bp1995@yandex.ru

Глиомы относят к распространенным и агрессивным опухолям головного мозга. Стандартные методы лечения, включающие резекцию опухоли, ионизирующее излучение и химиотерапию, не исключают рецидивы. Это объясняется как особенностями локализации, так и высокой гетерогенностью опухоли и резистентностью к терапии. В настоящее время одним из важных звеньев злокачественного процесса считают изменение экспрессии микроРНК, которые транспортируются, в том числе и в составе микровезикул. Однако эффективность использования экзосом и их компонентов в клинической практике в качестве онкомаркеров прежде всего зависит от методов выделения микровезикул.

Задачи исследования: сравнение методов выделения экзосом из культуральной среды и плазмы крови пациентов с глиомой.

Объект и методы исследования: плазма крови и материал операционной биопсии пациентов со злокачественными опухолями головного мозга (grade II-IV), диагноз верифицировался по результатам МРТ, патоморфологического исследования, иммуногистохимии. Культивирование проводили в условиях инкубатора (5% CO_2, 37 °C) в среде DMEM/F12 с добавлением фетальной бычьей сыворотки без экзосом (Fetal Bovine Serum exosome-depleted; Thermo Fisher) и в среде DMEM/F12, обогащенной FGF2, EGF и B27. Экзосомы выделяли методами дифференциального центрифугирования в Exosome Isolation Kit (Invitrogen) и магнитной сепарации (Miltenyi Biotec). Верификацию выделяемых экзосом проводили методом просвечивающей электронной микроскопии и вестерн-блотт анализа маркера CD63.

Результаты исследования: культивирование опухолевых клеток в DMEM/F12 с добавлением бычьей сыворотки приводит к дифференциации клеток опухоли, потенциальной потере пролиферативных и туморогенных свойств, что может искажать состав экзосом. Культивирование в среде, обогащенной FGF2, EGF и B27, сохраняет способность опухолевых клеток к продолжительному делению, способствует формированию глиосфер, способных образовывать новые колонии при пересеве. Оптимальный срок культивирования диссоциированных клеток глиомы для выделения экзосом составляет не менее 3 дней, при сокращении срока культивирования наблюдается неспецифический сигнал на вестерн-блоте, характерный для плазмы крови, полученной от тех же пациентов, исчезающий при более длительном культивировании. Выделение экзосом с помощью Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen) требует дополнительной очистки проб от сопутствующих липопротеинов, что снижает концентрацию экзосом в пробе. Эффективность и селективность выделения микровезикул с помощью магнитной сепарации (Miltenyi Biotec) значительно выше: интенсивность сигнала на блоте различается в 5 раз.

Работа поддержана внутренним грантом ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России.

П.В. Пчелин[1,2], М.А. Коротыш[3], Т.Ф. Ковалёва[2], С.В. Копишинская[2], И.В. Мухина[1,2]

МИТОХОНДРИАЛЬНОЕ ДЫХАНИЕ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГЕНТИНГТОНА ИЗМЕНЯЕТСЯ ДО МАНИФЕСТАЦИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

[1] Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия
[2] Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия
[3] Медико-генетический центр «Геном», Нижний Новгород, Россия

P.V. Pchelin[1,2], M.A. Korotysh[3], T.F. Kovaleva[2], S.V. Kopishinskaya[2], I.V. Mukhina[1,2]

MITOCHONDRIAL RESPIRATION IN SKELETAL MUSCLES OF PATIENTS WITH HUNTINGTON'S DISEASE CHANGES BEFORE MANIFESTATION

[1] Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia
[2] Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia
[3] Medical Genetics Center "Genom", Nizhny Novgorod, Russia

ptch.pv@gmail.com

Болезнь Гентингтона (БГ) — наследуемое аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, связанное с экспрессией мутантного белка гентингтина в головном мозге и периферических тканях. Развитие БГ сопряжено с селективной гибелью нейронов стриатума и других отделов мозга, что приводит к появлению хореического гиперкинеза, нарушению поведения и когнитивных функций [1]. Ряд исследований указывает на связь развития БГ с патологическими процессами, протекающими не только в мозге, но и в скелетных мышцах, в частности, с атрофией мышц и нарушением биоэнергетики митохондрий [2]. Поэтому поиск митохондриальных изменений, которые могут служить потенциальным биомаркером появления и прогрессирования метаболических нарушений при БГ, является актуальным.

Цель исследования: выявить изменения в динамике дыхания митохондрий в скелетных мышцах пациентов с преманифестной и манифестной стадиями болезни Гентингтона.

Объект исследования: образец биопсии мышечной ткани (в среднем 5–6 мг) латеральной широкой