



# Иммуногенетическая лаборатория

НИИ КП АГУ



# **Иммуногенетическая лаборатория НИИ комплексных проблем**

**Годовой отчет за 2015 г.**

**Руководитель: д.б.н. Тугуз А.Р.**

# Сотрудники иммуногенетической лаборатории

- Тугуз А.Р. д.б.н. - зав. лабораторией
- Муженя Д.В. – к.б.н. инженер - генетик
- Руденко К.А. – инженер - молекулярный биолог
- Шумилов Д.С.- аспирант
- Смольков И.В.- аспирант
- Татаркова Е.А.- аспирантка

**Тема:** Исследование иммуногенетических механизмов развития злокачественных новообразований, сердечно-сосудистых и аутоиммунных заболеваний на примере населения Республики Адыгея.

**Актуальность:**

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), солидные злокачественные новообразования (ЗНО) женских репродуктивных органов, хронические воспалительные заболевания легких (ХВЗЛ) – бронхиальная астма (БА) относятся к социально значимым заболеваниям, на лечение которых расходуется до 10% ресурсов общественного здравоохранения, а социально-экономический ущерб определяется прямыми и косвенными медицинскими затратами, связанными в первую очередь с высокой смертностью. Проблема высокой заболеваемости и смертности населения обусловлена низкой эффективностью существующей первичной профилактики социально значимых заболеваний, связанная с проблемой выявления ведущего этиологического фактора их развития. Поэтому в мировой практике современных научных исследований по фундаментальной медицине большое внимание уделяют молекулярно-генетическим методам анализа с идентификацией генетических предикторов ЗНО женских репродуктивных органов, ХВЗ и ССЗ – полиморфизмов спектра маркерных генов.

## **Основные направления исследований:**

1. Анализ распределения протективных и ассоциированных с риском развития ССЗ, БА, ЗНО женских репродуктивных органов специфичностей HLA, полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов (TLR), спектра про- и противовоспалительных медиаторов иммунной системы - цитокинов, генов-супрессоров опухолевого роста (BRCA), интегринов, селектинов.
2. Формирование базы данных: «Протективные и ассоциированные с ССЗ, БА и ЗНО женских репродуктивных органов полиморфизмы генов в этнических группах населения РА».
3. Типирование полиморфных вариантов генов, влияющие на функциональную активность клеточного и гуморального звена иммунной системы: баланс цитокинов; функциональную активность мононуклеарных клеток крови (МНК), спонтанную и стимулированную продукцию медиаторов иммунной системы.

Предполагаемое использование результатов:

- Разработка и реализация программ охраны здоровья населения, сохранение биологической стабильности этносов на основе ранней донозологической диагностики социально-значимых заболеваний.
- Полученные результаты исследования будут использованы для формирования единого регионального информационного пространства по вопросам промоции здоровья, донозологической диагностики и профилактики, основных социально значимых заболеваний в декретированных группах населения.

Проект разработан в соответствии с законодательными документами РФ в системе здравоохранения:

- Распоряжение Правительства РФ № 2511-р от 24 декабря 2012 года об утверждении «Государственной программы развития здравоохранения Российской Федерации»;
- Федерального закона Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»;
- Рекомендации №206-ВС от 15 января 2008 г.;
- Приказа Минздравсоцразвития России №187 от 22 марта 2006 г.

# Тема:

Исследование иммуногенетических механизмов развития злокачественных новообразований, сердечно-сосудистых и аутоиммунных заболеваний у жителей Республики Адыгея (РА)

# Методы:

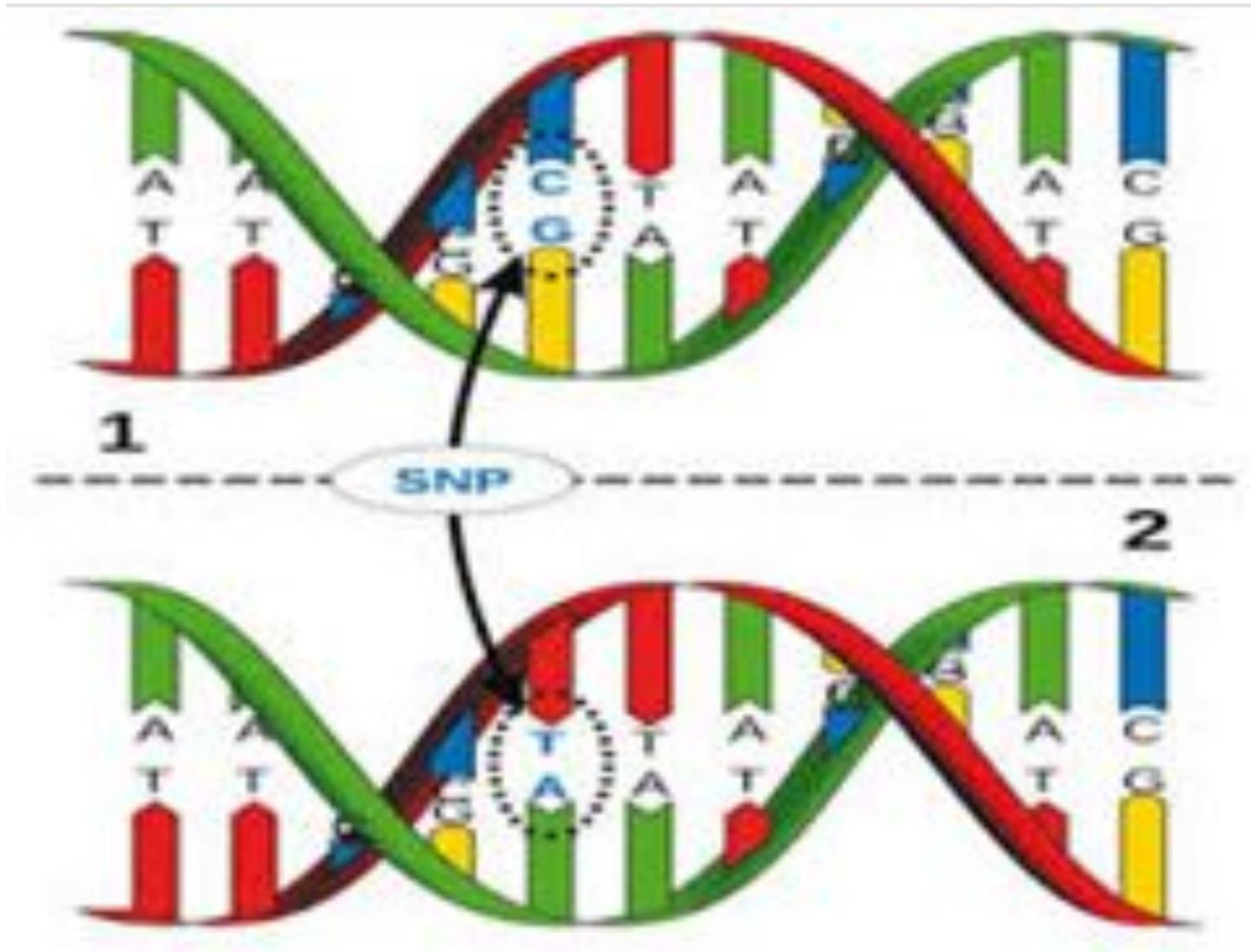
Полимеразная цепная реакция



# Возможности ПЦР

- Типирование генных мутаций, связанных с заменой, делецией или инверсией одного или нескольких нуклеотидов.
- Исследование однонуклеотидных полиморфизмов или SNP (от англ. Single nucleotide polymorphism) – отличий последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме человека, которые могут быть ассоциированы с социально-значимыми мультифакторными заболеваниями

# SNP - Single nucleotide polymorphism



# Методы:

## Иммуноферментный анализ (ИФА)



# Выделение из биоматериалов и культивирование клеточных линий:

нейтрофилов

мононуклеарных клеток (МНК)

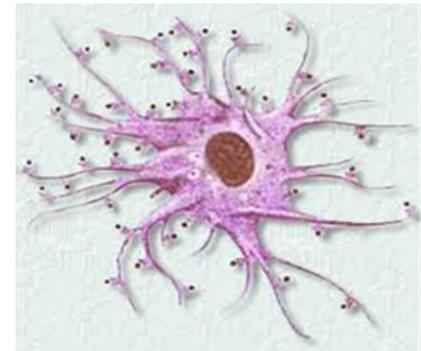
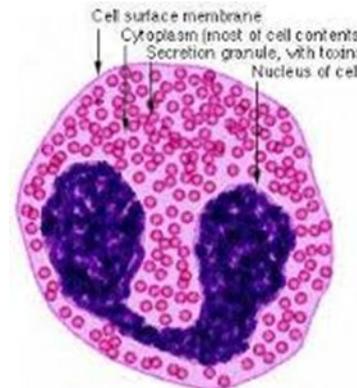
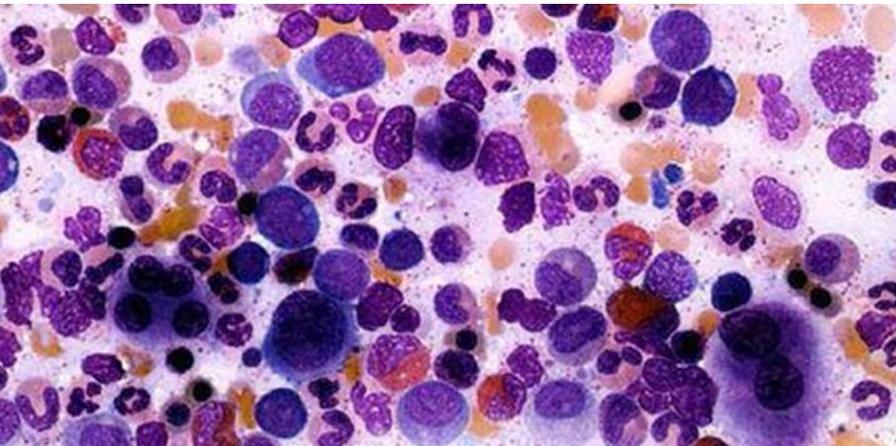
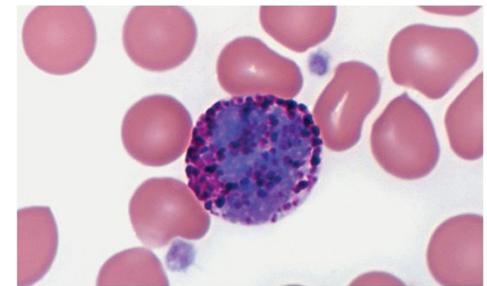
периферической крови

дендритных, опухолевых

клеток



Medic-ABC.ru



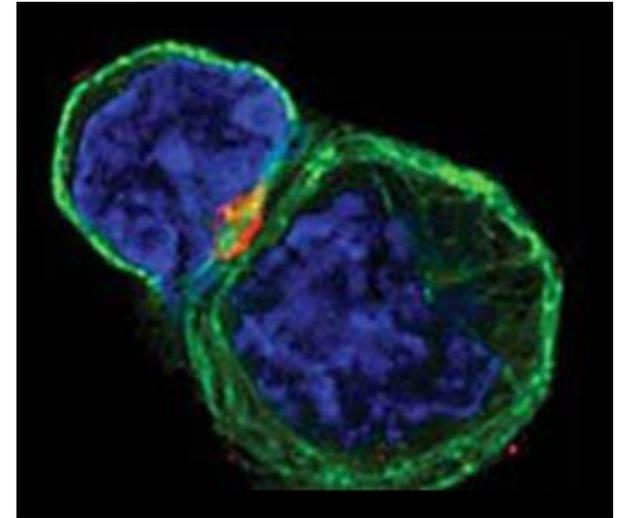
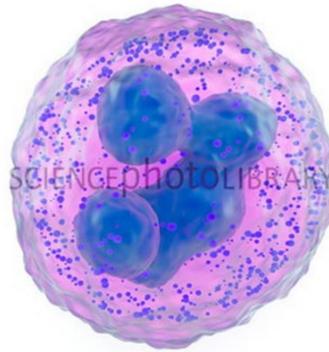
# Иммунофенотипирование

## лимфоцитов, дендритных, стволовых, опухолевых

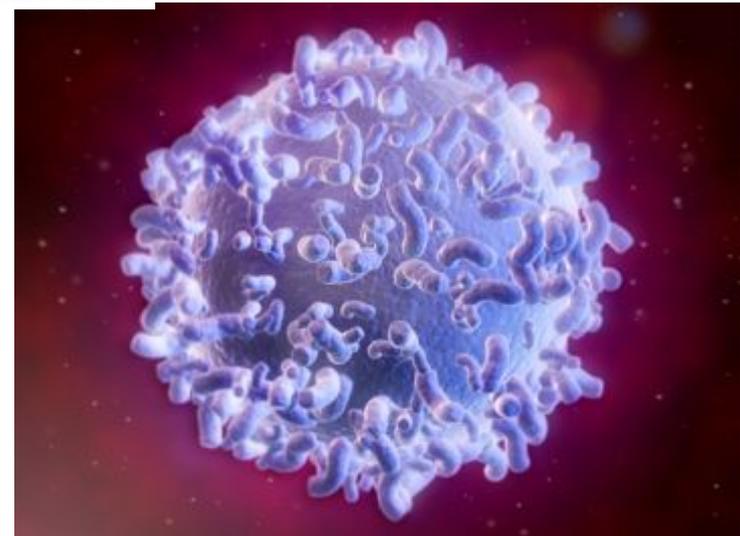
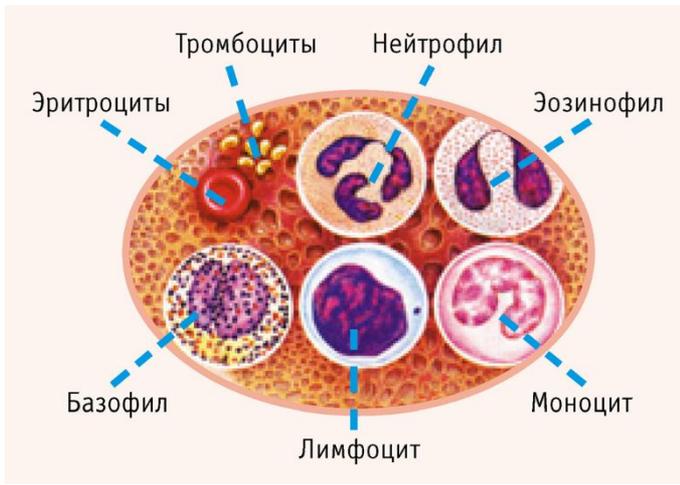
Иллюстрации из интернета



клеток



Medic-ABC.ru



# Дендритная клетка (красная, с синим ядром) поглощает лейшманию (зелёный)

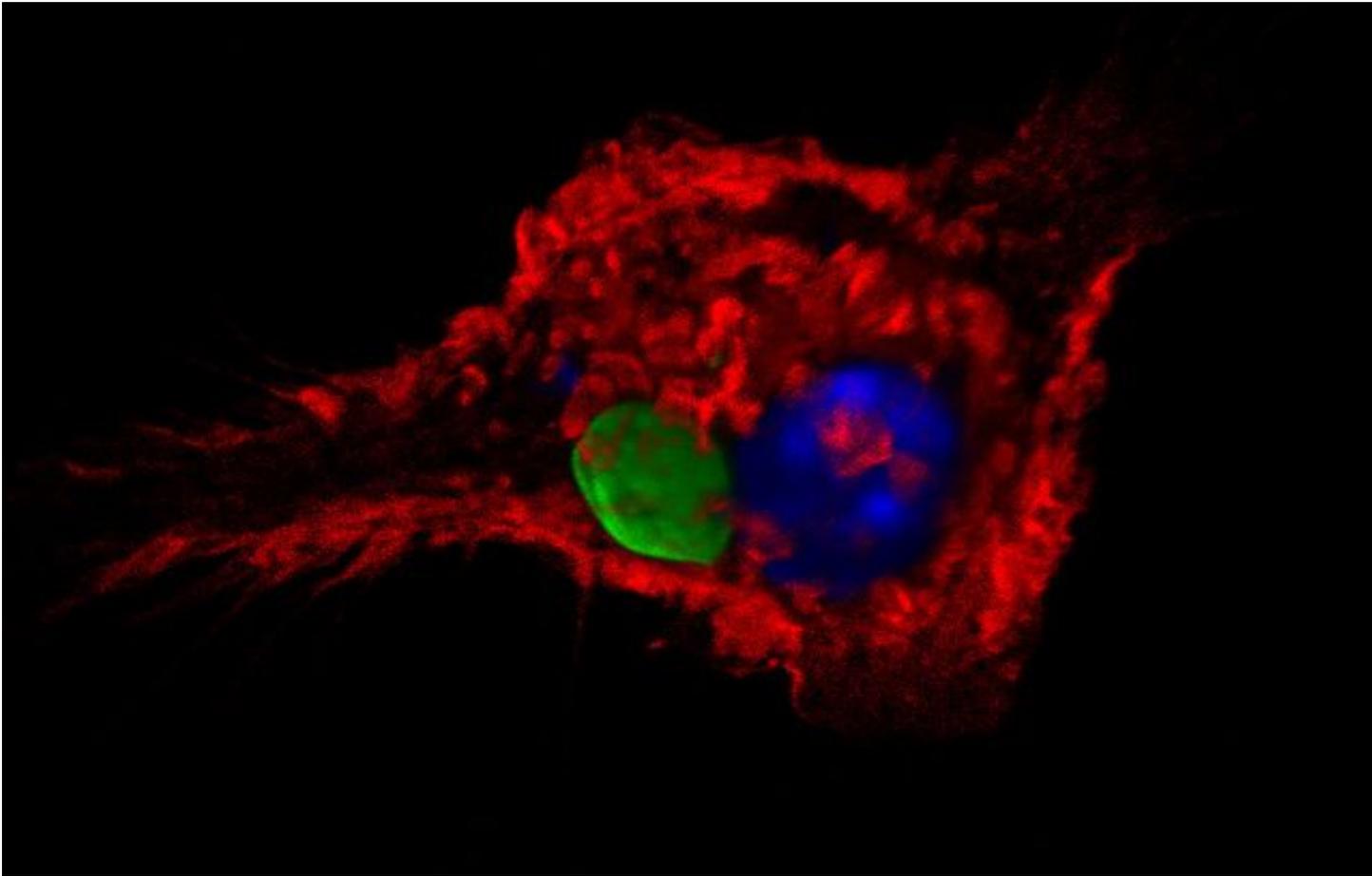
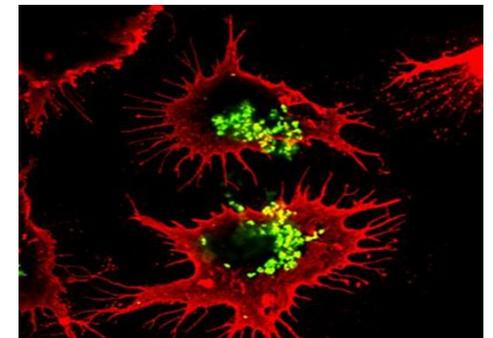
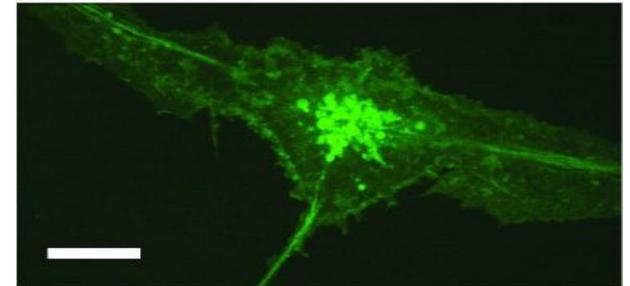
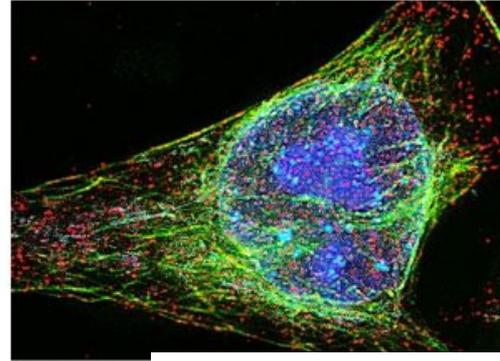
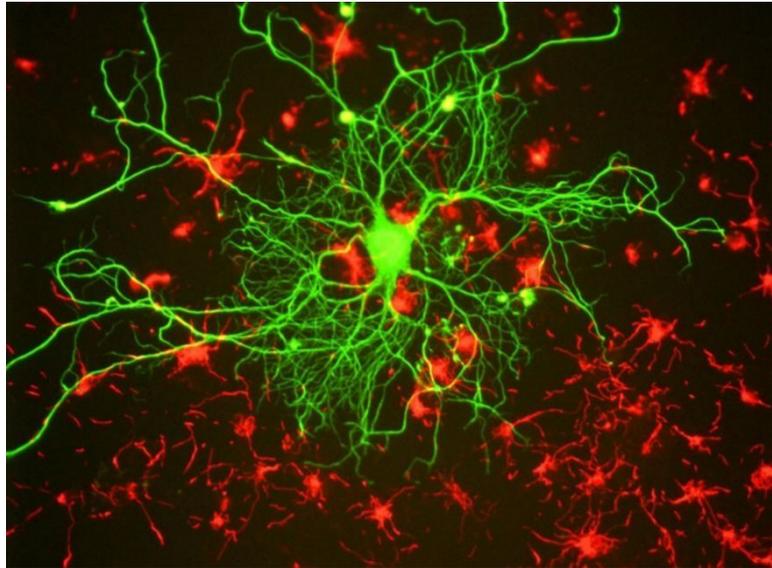


фото из интернета

# Иммуногистохимия

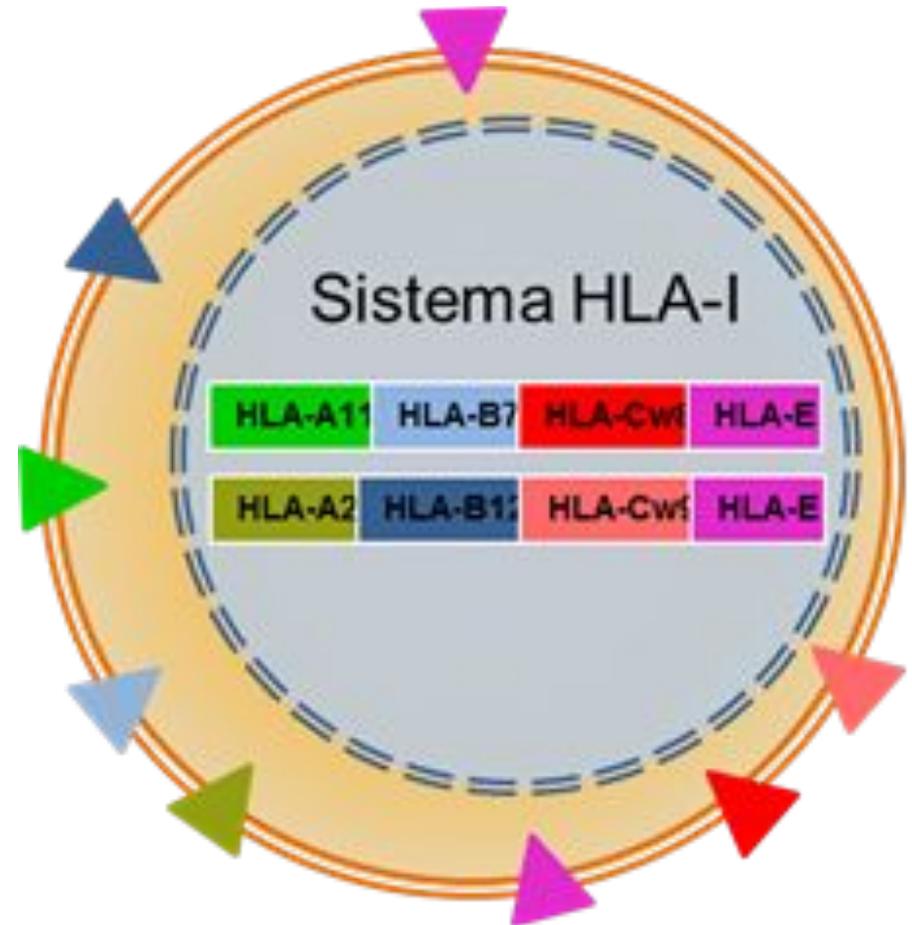
фото из интернета



# HLA-типирование специфичностей

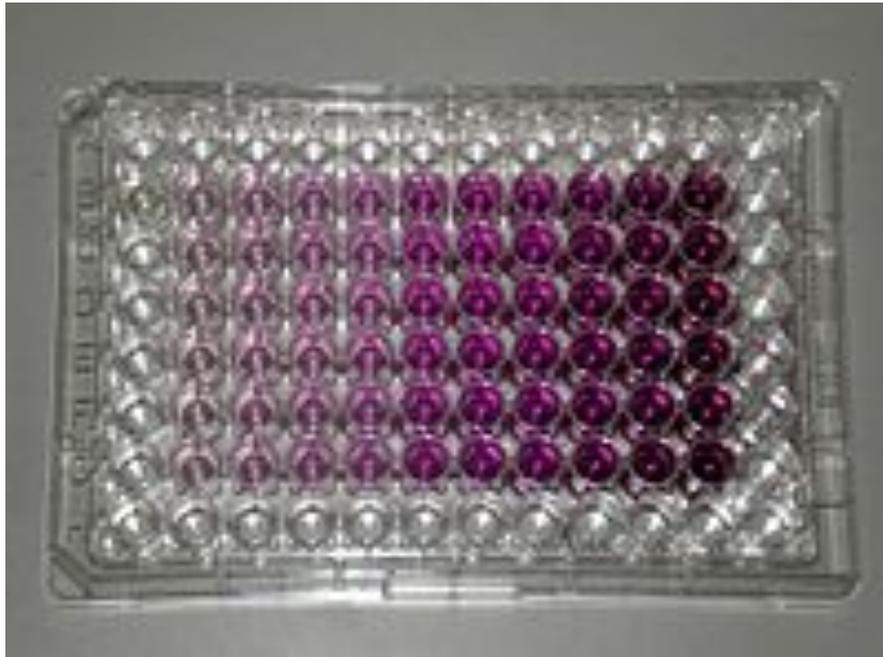
## главного комплекса гистосовместимости

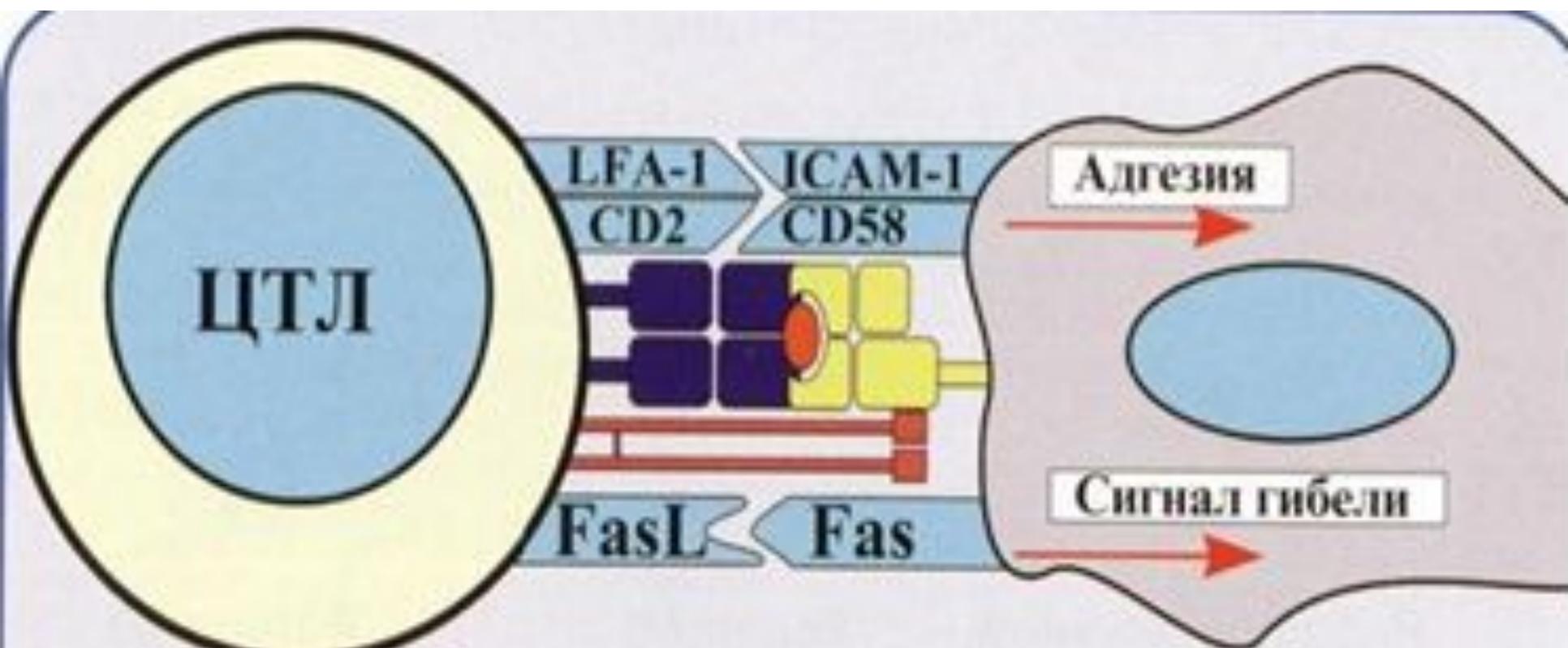
Индивидуальная  
устойчивость или  
предрасположенность  
к сердечно-  
сосудистым,  
онкологическим и др.  
заболеваниями



# Цитотоксический тест

Анализ киллерной активности лимфоцитов:  
противоопухолевой цитотоксической активности  
природных и синтетических соединений с  
использованием витального красителя бромид  
3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тертазолия (МТТ).





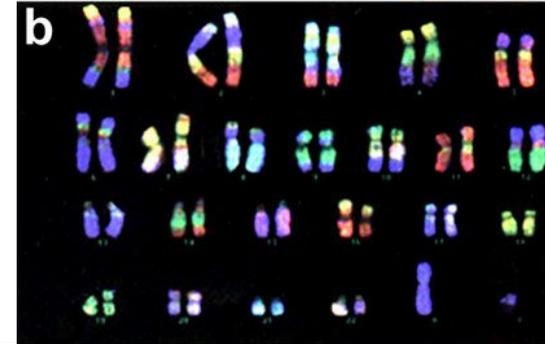
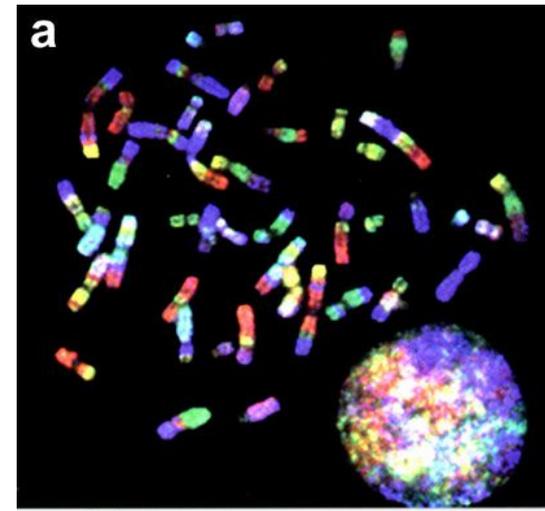
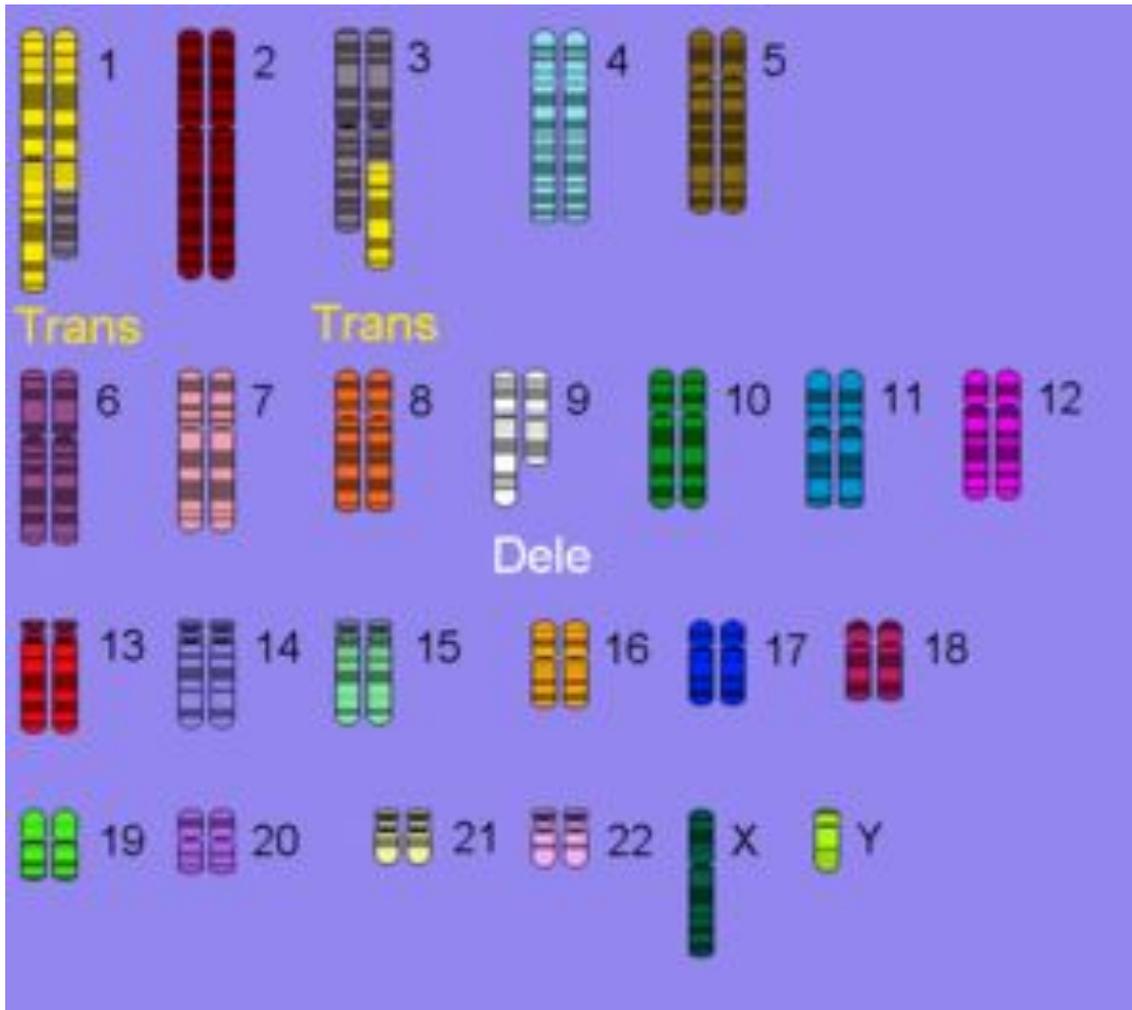
Цитотоксический лимфоцит

Клетка-мишень



# Кариотипирование

Выявление хромосомных  
нарушений (иллюстрации из интернета)



# Оборудование лаборатории

# Детектирующий амплификатор ДТ-Лайт

Система ПЦР в  
режиме реального  
(PCR-Real-Time)  
времени для  
использования в  
научных и клиничко-  
диагностических  
лабораториях.



# Амплификатор (термоциклер)

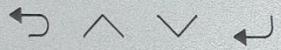
Mj Mini, Био-Рад с программируемым режимом амплификации





Мерчик

1 ● 2  
3 ● 4



DFK - Мехкоорус



# Thermo Scientific NanoDrop™



Микрообъемные  
(на 2 микролитра)  
спектрофотометры  
серии NanoDrop™  
предназначены для  
измерения  
концентрации  
ДНК, РНК и белка.

## **Трансиллюминатор (Gel Doc XR).**

Используются для визуализации результатов электрофореза при длине волны 310 нм с помощью программы Quantity One.



## **Microplate reader (BIO-RAD)**

иммуноферментный  
анализатор

# Микроскоп инвертированный Axiovert Vert. A1. Zeiss.



wie-tec.de

Axio Vert.A1 - микроскоп для клинической диагностики, цитологии, гистологии, микробиологии, в биотехнологии, генной инженерии, вирусологии, клеточной биологии, нейробиологии, исследований живых клеточных культур в лабораторной посуде.

# Система для микроскопии в проходящем свете EVOS<sup>®</sup> XL



Усовершенствованная система для визуализации клеток в проходящем свете

**Ключевые методики:**

колориметрическая визуализация клеток, пассирование стволовых клеток, интервальная съемка, подсчет клеток, гематоксилиновая, эозиновая и диаминбензиденовая (DAВ) визуализация

**Лабораторный шейкер ST-3  
Elmi термостатируемый**  
предназначен для создания  
вращательного движения  
жидкости и точного  
поддержания заданной  
температуры в  
иммунологических  
планшетах.





*Sky Line*

TEMPERATURE	RPM	TIMER	SHAKER ST-3L
8.8.8.8.8	8.8.8.8	8.8.8	⏻
⏮ ⏭	⏮ ⏭	⏮ ⏭	



**Sanyo (Panasonic)**

CO<sub>2</sub>-инкубатор,

170 л,

MCO-19A1C (UV),

воздушная рубашка,

IR, УФ-лампа.

Диапазон температуры,

от +5 до +50С<sup>0</sup>;

Диапазон CO<sub>2</sub>, % :

от 0 до 20 ± 0,15;

Шаг регулировки t<sup>0</sup> -

С — 0,1



**Морозильник -86°C,**  
вертикальный, 483 л,  
MDF-U5386S, Sanyo  
Регулируемый  
диапазон температур,  
**от -5° до -86С°;**  
дискретность  
установки  
температур, С — 1;  
объем камеры: 483л;



CENTRIFUGE CM-50

MIN RPM x 1000

8.8 8.8

• G  
• RPM



ПЦР - БОКС

*ДФК - Механика*



# Участие в научных мероприятиях:

- 18-я международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», 20-26 апреля 2014 г. (г. Москва) – Руденко К.А., Татаркова Е.А.

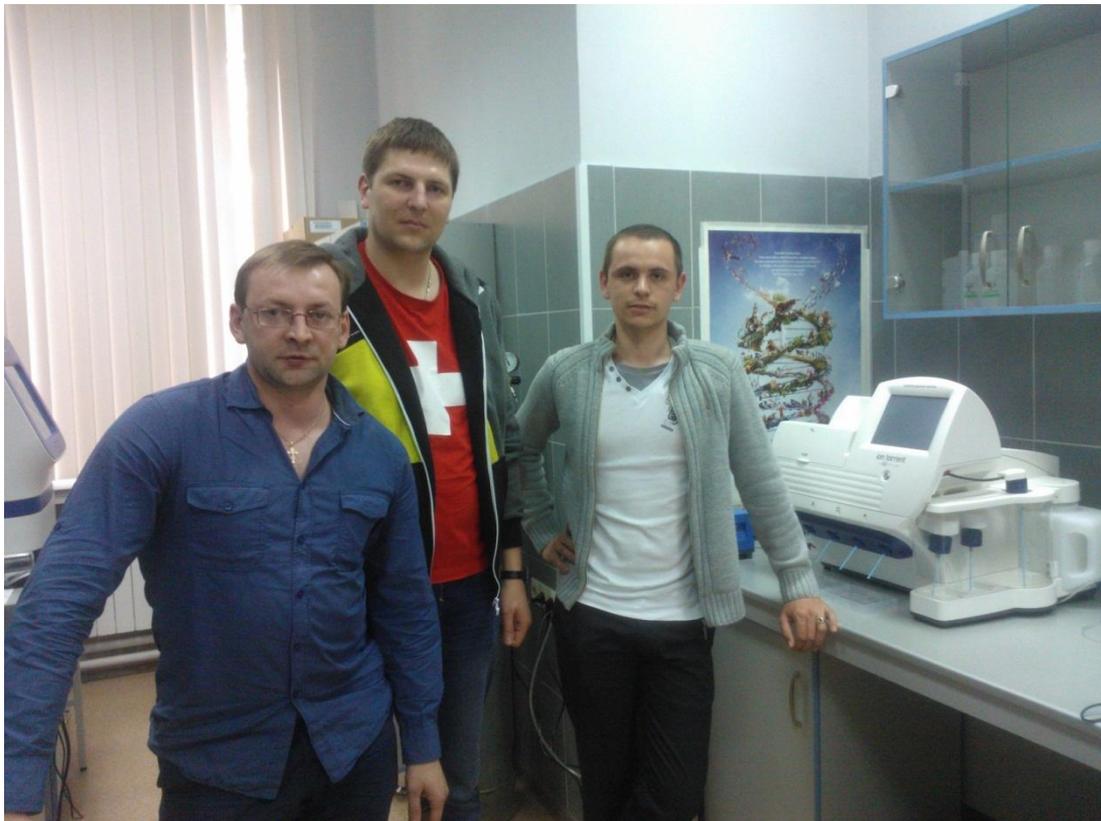


- *VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы, 15-20 июня 2014 г. (г. Ростов-на-Дону) – Шумилов Д.С., Смольков И.В.*



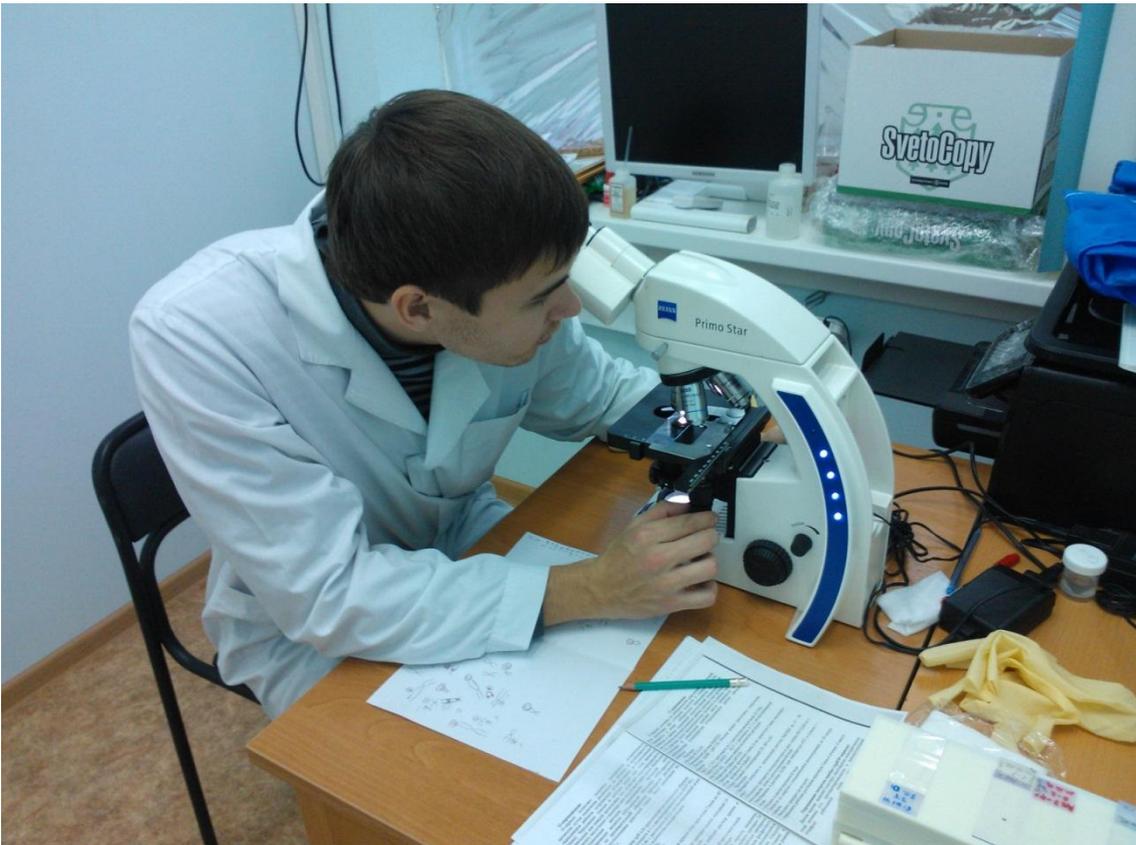
# *Научные стажировки:*

- *Изучение современных методов генотипирования ДНК*, 22-23 апреля 2014 г. (г. Москва, на базе «Агентство-Химэксперт») – Шумилов Д.С., Муженя Д.В.



**• Методы культивирования лимфоцитов человека и анализа хромосом человека,**

**• 5-14 ноября 2014 г. (г. Ростов-на-Дону, на базе ФБГОУ ВПО «ЮФУ») Смольков И.В., Шумилов Д.С.**



## Очное участие в конференциях

Наименование	Дата и место проведения
VIII Ежегодная конференция студентов и аспирантов базовых кафедр ЮНЦ	2012г. 11-26 апреля г. Ростов-на-Дону
Фестиваль науки недели Юга	2012г. 28-29 ноября г. Ростов-на-Дону
17-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века»	2013г. 21-26 апреля г. Пущино
X Международная научно-практическая конференция молодых ученых «Наука. Образование. Молодежь»	2013г. 7-8 февраля г. Майкоп
18-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века».	2014г. 20-26 апреля г. Пущино.
VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы	2014г. 15-20 июня г. Ростов-на-Дону
«Механизмы функционирования нервной, эндокринной и висцеральной систем в процессе онтогенеза»	2015г. 8-9 октября г. Майкоп

# Работа со студентами и аспирантами

- .Обучение методам исследования и статистической
- .Выбор научного направления
- .Работа с международными базами данных и научной литературой
- .Анализ и обсуждение литературных данных с руководителем
- .Подготовка обзора по теме исследования
- .Определение предмета и объекта исследования
- .Планирование и выполнение экспериментальной части
- .Обработка и обсуждение полученных данных по разделам
- .Подготовка результатов исследования к публикации
- .Завершение экспериментальных исследований
- .Оформление и защита диссертации

# Результаты работа с аспирантами

# Защита диссертации

**21 июня 2013**

*Муженя Д.В. «Особенности адаптивных возможностей кардиореспираторной системы квалифицированных спортсменов с учетом молекулярно-генетических детерминант».*

АГУ, диссертационный совет Д212 001 07 (г. Майкоп)

*Специальность - 03.03.01 - физиология*

Руководитель: д.б.н. Тугуз А.Р.

# Защита диссертации

23 октября 2015

*Руденко К.А. «Специфичности HLA DR B1, полиморфизмы генов цитокинов и TLR, ассоциированные с бронхиальной астмой у жителей Республики Адыгея».*

НИИ вакцин и сывороток им. И. Мечникова (г. Москва)

*Специальность - 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология.*

Руководитель: д.б.н. Тугуз А.Р.

# Защита диссертации

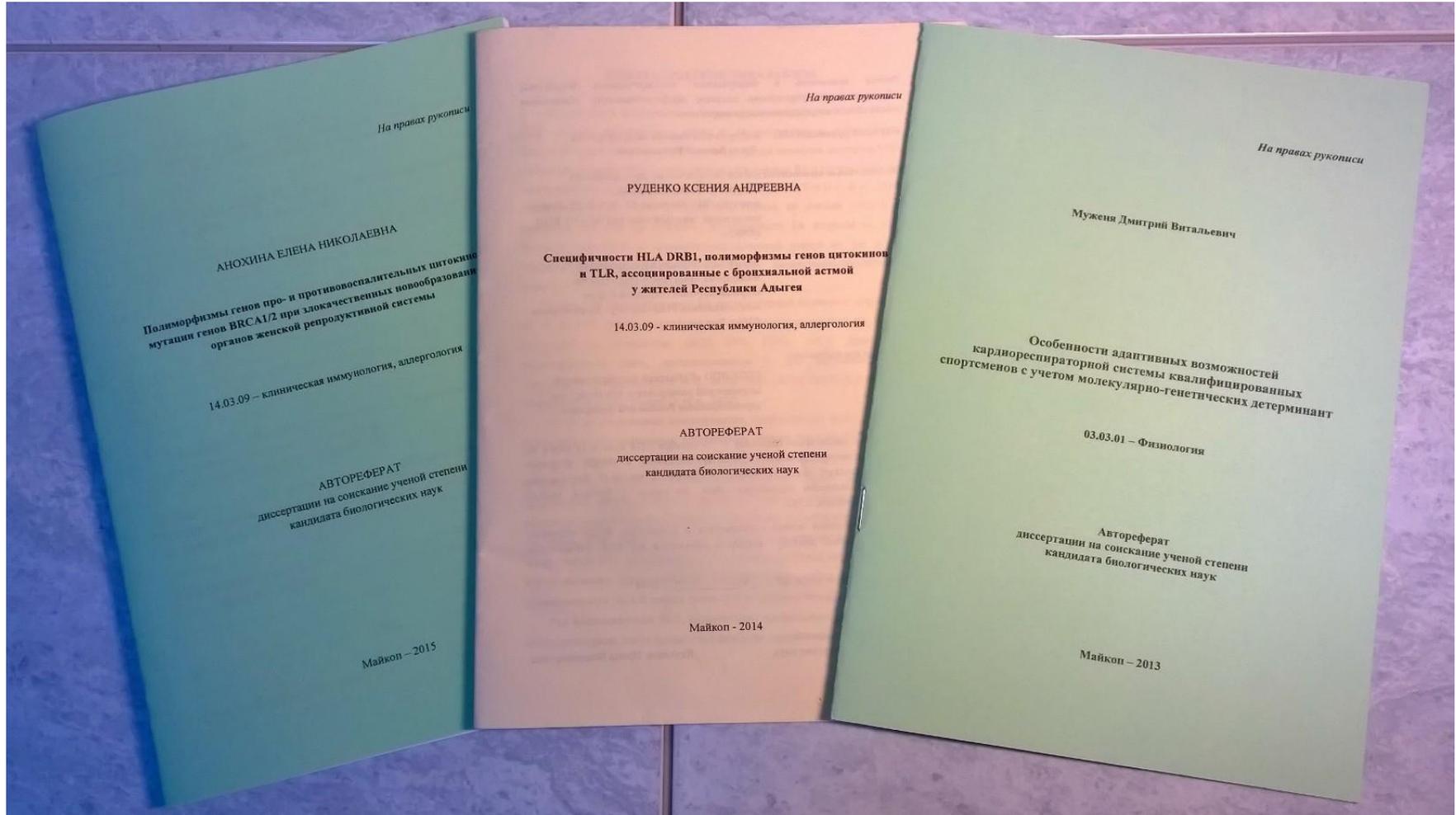
**18 июня 2015 г.**

**Анохина Е.Н.** *«Полиморфизмы генов про-, противовоспалительных цитокинов, мутации генов BRCA1/2 при злокачественных новообразованиях органов женской репродуктивной системы».*

**НИИ вакцин и сывороток им. И. Мечникова (г. Москва)**  
*Специальность - 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология.*

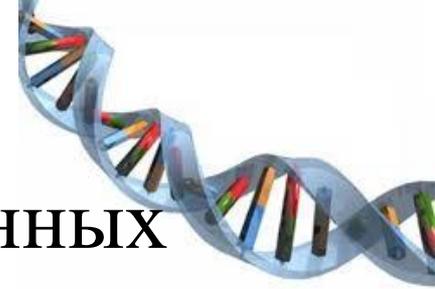
**Руководитель: д.б.н. Тугуз А.Р.**

# Защита диссертации



# Постановка ПЦР

№	Ген	Полиморфизм	Кол-во тест систем	Кол-во образцов ДНК	Затраченное время на постановку (часы)	Затраченное время на подготовку (часы)
1	AGT2R1	A1166C	1	60	8	2
2	JAK2	Val617Phe	1	60	8	2
3	IL-12B	A1188C	1	60	8	2
4	IL-17A	G197A	2	120	16	4
5	ITGB3	Leu33Pro	2	240	24	4
6	ITGA2	C807T	2	240	24	4
7	SELE	Ser128ArGet	2	240	24	4
8	SELP	Thr715Pro	2	240	24	4
9	MTHFR MTHFR MTRR MTR	C677T A1298C A66G A2756G	2	96	46,5	4
<b>Итого:</b>			14	1356	182,5	30



# Планируемые защиты диссертационных исследований аспирантами иммуногенетической лаборатории

- Шумилов Д.С. 2017 г. - Молекулярно-генетические предикторы коронарного атеросклероза в этнических группах населения Республики Адыгея. (14.03.09 )
- Смольков И.В. 2017г. - Полиморфизмы генов, ассоциированные с периферическим атеросклерозом в этнических группах населения Республики Адыгея. (14.03.09 )
- Татаркова Е.А. 2017г. - Иммунологические и молекулярно-генетические предикторы раннего прерывания беременности у жительниц Республики Адыгея. (14.03.09 )

## Выделение ДНК

<b>№</b>	<b>Метод выделения</b>	<b>Кол-во образцов</b>	<b>Кол-во постановок</b>	<b>Время на 1 постановку</b>	<b>Общее время</b>
1	«Днк - эксперсс кровь» «ЛиТех»	385	20	1,45	29 ч.
2	«Проба ГС-генетика» «ДНК-технология	385	20	4	80 ч.
<b>Итого:</b>					109 ч.

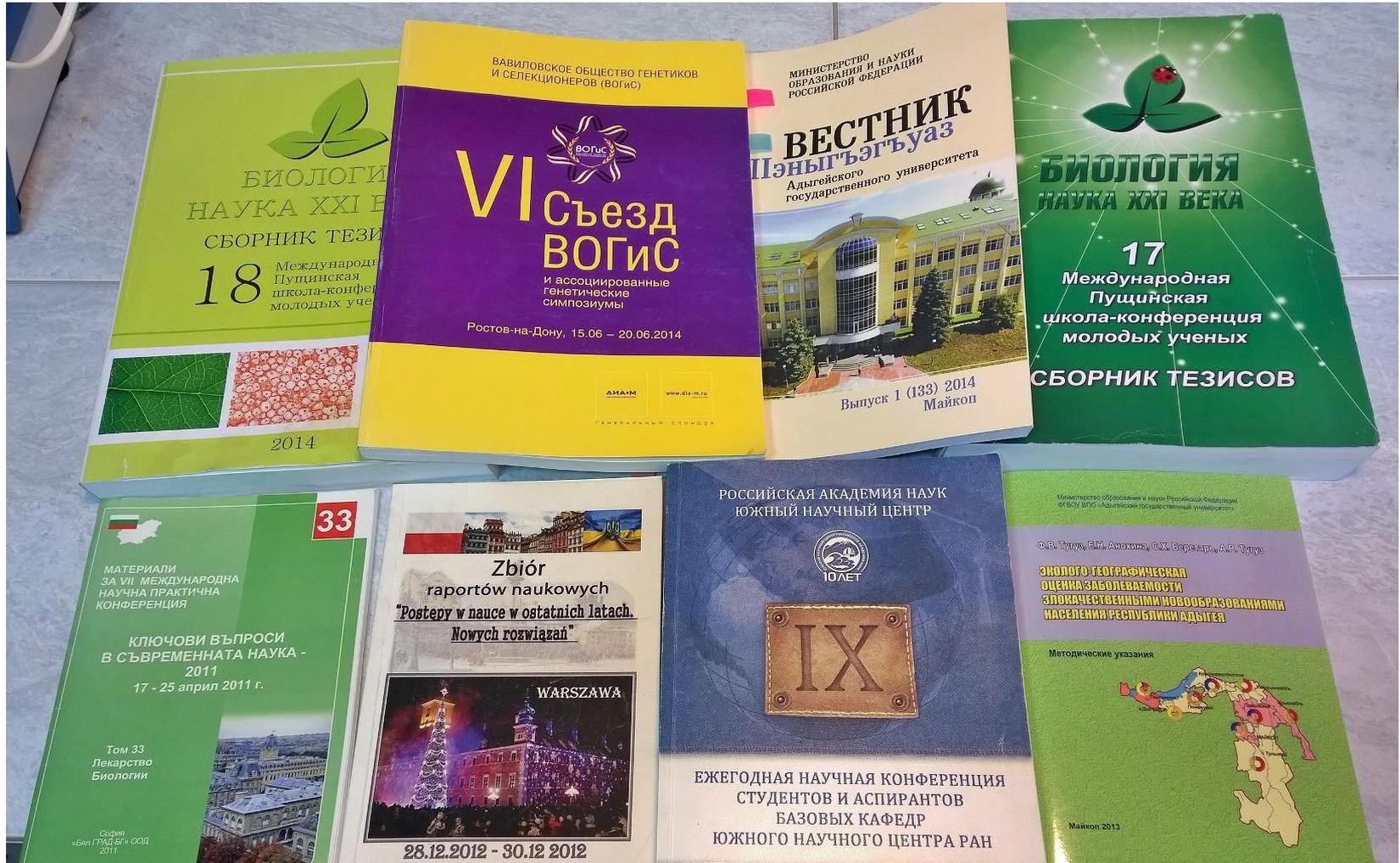
## Цитотоксический тест

<b>№</b>	<b>Кол-во образцов</b>	<b>Кол-во постановок</b>	<b>Время на 1-ну постановку</b>	<b>Общее время</b>
1	66	11	24 ч.	264 ч.

## Публикации аспирантов

Ф.И.О.	По теме диссертации	Другие публикации	Всего работ
Муженя Д.В.	10	41	51
Руденко К.А.	16	32	48
Анохина Е.Н	11	34	45
Татаркова Е.А.	4	10	14
СМОЛЬКОВ И.В.	5	14	19
ШУМИЛОВ Д.С.	4	15	19

# Публикации 2010-2016 гг.:



# **Публикационная активность аспирантов 2010-2015 гг.**

**Статьи в научных журналах – 32**

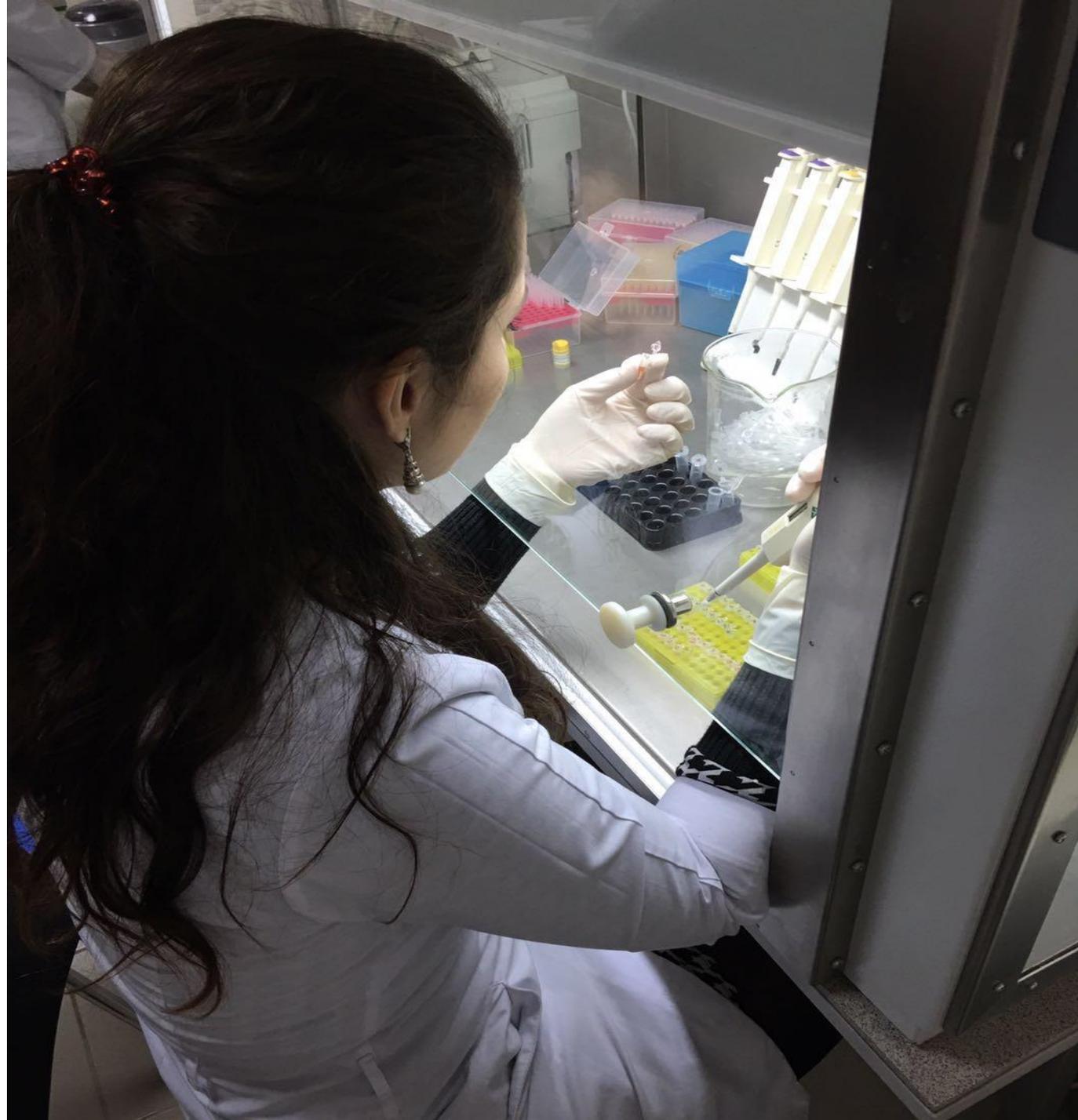
в том числе:

- 1. Scopus - 4;**
- 2. Web of Science – 3;**
- 3. ВАК - 25**

**Тезисы и материалы конференций - 23**

# Работа со студентами

- .Обучение методам исследования и статистики
- .Работа с международными базами данных
- .Анализ и обсуждение литературных данных с руководителем
- .Подготовка обзора по теме исследования
- .Определение предмета и объекта исследования
- .Выбор темы дипломного проекта
- .Планирование и выполнение экспериментальной части
- .Обработка и обсуждение полученных данных по разделам
- .Подготовка результатов исследования к публикации
- .Завершение экспериментальных исследований
- .Оформление и защита дипломной работы



**Работа со школьниками**

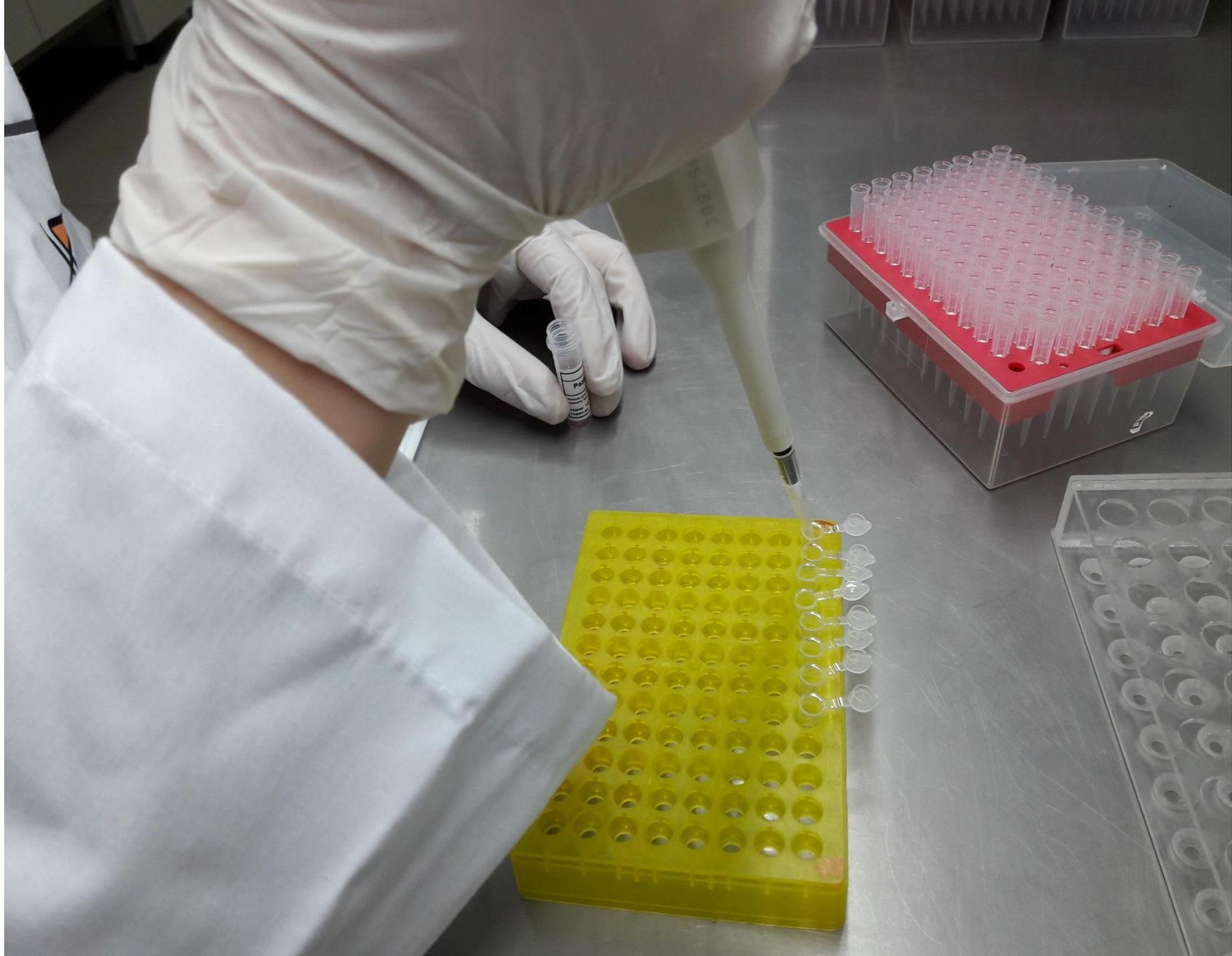
**РЕМШ**

# Работа со школьниками

- .Ознакомление с научным направлением лаборатории
- .Совместные экспериментальные исследования с аспирантами и студентами
- .Обучение методам исследования и статистической обработки результатов
- .Работа с литературными источниками, включая международные базы данных
- .Анализ результатов экспериментальных исследований с аспирантами и студентами
- .Обработка и обсуждение полученных данных
- .Выступление на научной конференции













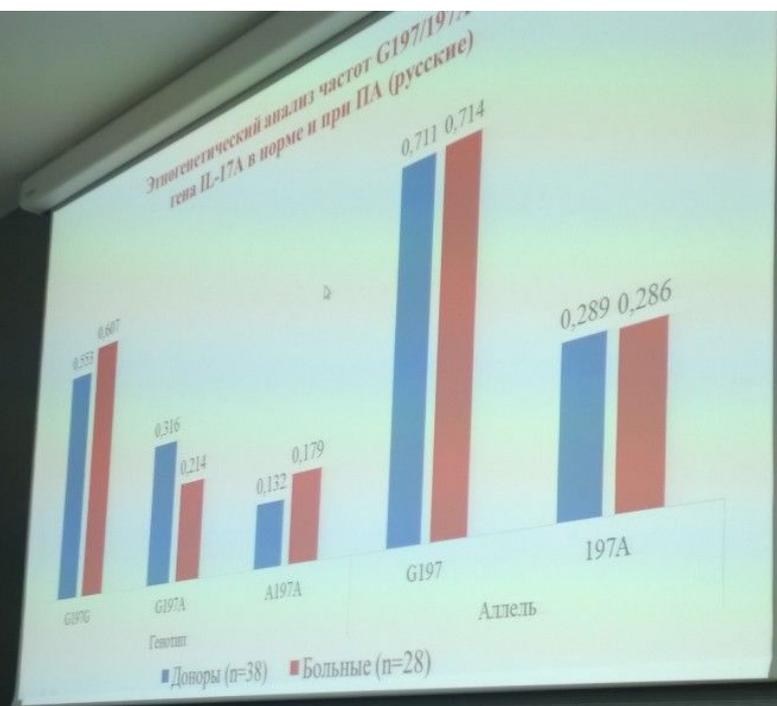






**Время подготовки учащихся РЕМШ – 42 часа  
(1,5 месяца)**

**под руководством аспирантов:  
Шумилова Д.С., Татарковой Е.А.**



**Выступление на научной конференции РЕМШ апрель 2016 г.**





**Выступление на 56 студенческой научной конференции АГУ апрель 2016**

Институт в CRG Барселоне  
(<http://www.crg.eu/>)

Школа Молекулярной и Теоретической Биологии (ШМТБ) организована Фондом Дмитрия Зимина «Династия» с 2012 г.

В 2015 г школа поддерживается медицинским институтом имени Говарда Хьюза, Howard Hughes Medical Institute.

# Концепция школы молекулярной и теоретической биологии ШМТБ

Концепция школы основана на убеждении, что многие старшеклассники готовы к участию в научных экспериментах – как интеллектуально, так и практически. Опыт работы в научной среде, в настоящих лабораториях будет полезен для тех старшеклассников, которые должны решить, хотят ли они заниматься наукой и подходит ли им этот род деятельности.

Школа даёт шанс поработать над настоящими научными задачами бок о бок с настоящими учёными и — ВОЗМОЖНО — внести вклад в исследования научной лаборатории. По ходу работы школьники слушают лекции, осваивают научные методы, учатся делать расчёты и проверять рабочие гипотезы в различных областях молекулярной и теоретической биологии. Школа не имеет отношения к подготовке к экзаменам и олимпиадам..

Работа и исследования  
сконцентрированы исключительно на  
процессе научной деятельности и  
конкретных научных задачах, которыми  
занимаются приглашенные учёные в  
своих лабораториях.

- В Пущине прошла 15-ая экологическая научно-практическая конференция школьников Южного Подмосковья «Экополис – город будущего».
- Организаторами мероприятия выступили отдел образования города Пущино и Детско-юношеский центр «Радуга», при непосредственном участии Пущинского научного центра РАН, совета молодых учёных РАН, Окского экологического фонда и Общественной палаты Московской области.
- В конференции участвовали ученики из Пущина, Серпухова, Чехова, Подольска, Ступинского и Ленинского районов, а также из соседних Грызлова, Турова, Липиц. В этом году впервые в конференции принял участие Коломенский район. Темы докладов были самыми разнообразными: «Изучение биологической очистки сточных вод с помощью активного ила», «Биохимическая роль металлов в организме человека», «Влияние синтетических моющих средств на зелёные водные

**Спасибо за внимание!!!!**