© Коллектив авторов, 2016
УДК 579.61:616-078:579.852.11
DOI – <http://doi.org/10.14300/mnnc.2016.11135>
ISSN 2073-8137

РАЗРАБОТКА МЕТОДА АНАЛИЗА ЕДИНИЧНЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ *BACILLUS ANTHRACIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИНИСЕКВЕНИРОВАНИЯ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Е. И. Еременко, В. В. Воропаев, Е. А. Котенева, А. Г. Рязанова,
А. Ю. Аксенова, О. И. Цыганкова, Н. П. Буравцева, А. Н. Куличенко

Ставропольский противочумный институт, Россия

DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR ANALYSIS OF *BACILLUS ANTHRACIS* SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS USING THE MINI SEQUENCING AND MASS SPECTROMETRY

Eremenko E. I., Voropayev V. V., Kotenyova E. A., Ryazanova A. G.,
Aksyonova L. Yu., Tsygankova O. I., Buravtseva N. P., Kulichenko A. N.

Stavropol Anti-Plague Institute, Russia

Цель исследования: разработка метода SNP-генотипирования *B. anthracis* с использованием минисеквенирования и MALDI TOF MS.

Материал и методы: исследовали ДНК штаммов *B. anthracis*, масс-спектры олигонуклеотидов с использованием реактивов для ПЦР, масс-спектрометрии, амплификатора ДНК, MALDI TOF масс-спектрометра, методов ПЦР-амплификации, ДНК-секвенирования и MALDI TOF масс-спектрометрии, компьютерных программ, on line ресурса BLASTn и баз данных GenBank.

Результаты: сконструированы праймеры для минисеквенирования 13 канонических SNP *B. anthracis*, подобран состав нуклеозидтрифосфатов для реакций, отработаны параметры реакций минисеквенирования и MALDI TOF масс-спектрометрии, проверена воспроизводимость и корректность получаемых результатов методами аллель-специфической ПЦР-амплификации в режиме реального времени и прямого секвенирования.

Заключение: впервые разработан метод SNP-генотипирования *B. anthracis* на основе минисеквенирования и MALDI TOF масс-спектрометрии.

Ключевые слова: *B. anthracis*, генотипирование, минисеквенирование, MALDI TOF масс-спектрометрия

Objective: development of the method for the *B. anthracis* SNP-genotyping using the mini sequencing and MALDI TOF MS.

Material and methods: DNA of *B. anthracis* strains, oligonucleotides mass specters using reagents for PCR, mass spectrometry, DNA amplifier, MALDI TOF mass spectrometer, methods for PCR amplification, DNA sequencing and MALDI TOF mass spectrometry, computer hardware, BLASTn on line resource and GenBank data base were used.

Results. Primers for the 13 *B. anthracis* canonical SNPs mini sequencing and nucleoside triphosphates composition were designed, parameters for mini sequencing reaction were developed, reproducibility and correctness of obtained results by methods of real time allele-specific PCR amplification and direct sequencing were checked.

Conclusion: method for the SNP-genotyping using the mini sequencing and MALDI TOF MS has been developed.

Keywords: *B. anthracis*, genotyping, mini sequencing, MALDI TOF mass spectrometry

B*acillus anthracis* является возбудителем особо опасной зоонозной инфекции, сибирской язвы, имеющей глобальное распространение и значимой для здравоохранения и ветеринарии. При эпидемиологическом расследовании вспышек инфекции как природного происхождения, так и обусловленных преднамеренным применением *B. anthracis* в качестве средства биотерроризма важно определить происхождение штаммов и пути распространения инфекции. Это позволяет сделать анализ генетических маркеров штаммов, сре-

ди которых особое место занимают единичные нуклеотидные полиморфизмы (SNP) в силу их консерватизма. М. Van Ert и соавт. описали систему генотипирования *B. anthracis* с анализом 13 так называемых «канонических» SNP (canSNP) [8]. Система дает возможность без исследования всего генома на основании анализа небольшого количества маркеров точно определить принадлежность штамма к одной из основных групп молекулярного разнообразия сибиреязвенного микроба, сделать предварительное заключение о его географическом про-

исхождении и подтвердить идентичность изолятов из одной вспышки. SNP-генотипирование *B. anthracis* стало востребованным подходом в микробиологии и эпидемиологии сибирской язвы. Сравнение результатов, полученных в разных лабораториях, реально благодаря наличию поддерживаемых on line баз данных, таких как MLVA bank for Microbes Genotyping (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>). В этом ресурсе есть раздел SNP-типирования сибирезавязного микроба, позволяющий соотнести свои данные с имеющимися в базе, классифицировать их и провести филогенетический анализ.

Предложено несколько методов SNP-генотипирования – аллель-специфическая ПЦР-амплификация, ПЦР-амплификация с анализом температуры плавления ампликонов высокого разрешения (HRM), технология SnaPshot, секвенирование и минисеквенирование локусов с SNP. Принцип минисеквенирования состоит в ферментативном достраивании праймера, непосредственно за 3'-концом которого следует единственный нуклеотидный полиморфизм в комплементарной матрице, на тот или иной один или несколько нуклеотидов в зависимости от варианта аллеля SNP. Детекция результатов может осуществляться по флуоресцентной метке (SNaPshot) или по различиям в массе между исходным и удлинившимся праймером методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Последний подход имеет преимущества перед вышеперечисленными методами, так как не требует флуоресцентно-меченых нуклеотидов или зондов с модифицированными нуклеотидами, наличия автоматических анализаторов ДНК, позволяет провести детекцию в мультиплексном варианте с меньшими затратами. Метод минисеквенирования в сочетании с MALDI-TOF MS разработан для анализа SNP возбудителя туберкулеза [4], нейссерий [2,6], вируса гепатита С [5], однако для возбудителя сибирской язвы он не описан.

Целью исследования была разработка метода SNP-генотипирования *B. anthracis* с использованием минисеквенирования и MALDI-TOF MS.

Материал и методы. Исследовали штаммы *B. anthracis* из музея живых культур института. Культуры *B. anthracis* выращивали на агаре по Хоттингеру, pH 7,2. Использовали ацетонитрил и 3-гидроксипиколиновую кислоту (Bruker Daltonics, Германия), дезокси- и дидезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTPs и ddNTPs соответственно), цитрат аммония двухосновного, щелочную креветочную фосфатазу (активность 1 ед/мкл) и ×10 буфер для щелочной фосфатазы (Thermo Scientific, США), катионообменную смолу W50-x8 (Bio-Rad, США), SNPase-ДНК полимеразу с антителами и ×5 ПЦР-буфер для SNPase-ДНК полимеразы («Биолинк», РФ), набор «ДНК-СорбВ», ×5 смесь dNTP, ×5 ПЦР-буфер (15 mM MgCl₂) и DiaTaq-полимеразу (2 ед/мкл) (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ).

Для выделения ДНК использовали 18-часовые культуры, выращенные при 37 °С. Все работы по пробоподготовке и обеззараживанию штаммов сибирезавязного микроба проводили в соответствии с СП 1.3.3118–13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». Выделение ДНК набором «ДНК-сорб-В» проводили согласно МУ 1.3.2569–09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР-амплификации областей с SNP, описанные M. Van Ert и соавт. [8] (табл. 1) и разработанные нами для минисеквенирования, синтезированы НПО «ДНК-синтез» (РФ). ПЦР и реакцию минисеквенирования проводили в термоциклере C-1000 DuoFast 48/48 (Bio-Rad, США). Масс-спектрометрическое определение размеров олигонуклеотидов после минисеквенирования проводили методом MALDI TOF-MS в приборе времяпролетный масс-спектрометр с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией Microflex LRF (Bruker Daltonics, Германия) в линейном режиме, используя азотный лазер с длиной волны 337 нм и частотой импульса 9 Hz в режиме положительных ионов. Время задержки анализатора – 200 нсек, напряжения на электроде ускорителя – 20,0 kV, накапливающим электроде – 17,1 kV, на фокусирующей линзе – 9,4 kV.

Таблица 1

Праймеры для амплификации областей генома с SNP

SNP	Нуклеотидная последовательность праймера, 5'→3'	
	Прямой	Обратный
A.Br.001	caagcggaaccaaatttaattcttt	ttcacgctacgtcattgtataatac
A.Br.002	aacgatacctaaatcgataaag	ggcagaaggagcaagtaattgtt
A.Br.003	gctactgtcattgtataaaacctcctt	cgcttgccaagctttttttc
A.Br.004	ccgataccagtaaaccgacgacat	ctggaattgggtggagctatgga
A.Br.006	ccggaattgctattagaacgaa	tcccaatctagcgttttaagtca
A.Br.007	ttggaacgagacgataaactgaataa	gccttggttgccgattg
A.Br.008	ttcgcaactacgctatacgttttagat	caaacggtgaaaaagttacaataatc
A.Br.009	ggcaatcgccactgttt	gggtttctactgtgtattgttaataaaaag
B.Br.001	tgcatgctctctctacagagtagttaat	cggtcataaaagaaatcggtacaa
B.Br.002	tggtgcactctctgtgttcgtt	gtagtggcttcaccgaatgga
B.Br.003	cattattcgcatagaagcagatga	tgtgccatcaataactcttctcaa
B.Br.004	gaagttaagtatcaaccagcagaagaaa	ccgcccgttgagctt
A/B. Br.001	gaaggtctccaatttgatttaaat	cggtgtaaccttcggttaaatagtc

Последовательность праймеров для минисеквенирования выбирали с использованием компьютерных программ UniproUGENE (РФ) и PerlPrimer (Австралия) v1.1.21, корректность их последовательностей проверяли, пользуясь on line Internet-ресурсом NCBI BLASTn.

Результаты и обсуждение. Разработка дизайна праймеров и реакционных смесей. Праймеры для удлинения в реакции минисеквенирования сконструировали, исходя из расположений 13 canSNP в геноме *B. anthracis* [8], таким образом, чтобы единственный нуклеотидный полиморфизм локализовался непосредственно у 3'-конца праймера и температуры отжига праймеров не отличались более чем на 2 °С (табл. 2). Правильность гибридизации праймеров проверяли в программе BLASTn (NCBI) в сравнении с геномом штамма Ames (код доступа GenBank AE016879.1).

Таблица 2

Состав праймеров, реакционных смесей для реакций минисеквенирования и молекулярные массы исходных и удлинённых праймеров

SNP	Замены оснований	Состав реакционной смеси		Праймер		Аллель 1	Аллель 2
				Последовательность праймера, 5'-3'	Мол. масса, Да	(Обозначение) и мол. масса, Да	(Обозначение) и мол. масса, Да
A.Br.001	C↔T	dT	ddG ddC	ATTTAATCTTTAAAGGAAAACCGAAA	7994	(C) 8267	(T) 9220
A.Br.002	G↔A com	dA	ddG ddC	TAAAGCGACTGCCGCCCA	5454	(G) 5767	(A) 6040
A.Br.003	G↔A com	dA	ddG ddC	AAACCTCCTTTTCTACCTCAA	6564	(G) 6894	(A) 7151
A.Br.004	C↔T	dT	ddC	CGCCGTCATACTTTGGAATG	6108	(C) 6381	(T) 6685
A.Br.006	A↔C	dC	ddA ddG	TTGTTGATCATTCATCGCCT	6338	(A) 6635	(C) 6947
A.Br.007	T↔C com	dT	ddA ddC	GATAAACTGAATAATACCATCCTTA	7617	(T) 8218	(C) 7890
A.Br.008	T↔G com	dG	ddT ddC	CGTTTTAGATGGAGATAATTCTTC	7373	(T) 7661	(G) 7975
A.Br.009	A↔G	dG	ddC ddA	CCACTGTTTTGAACGGCTTT	6378	(A) 6675	(G) 6981
B.Br.001	T↔C com	dC	ddT	TATGATACCGATACCTTCTTATC	6949	(T) 7237	(C) 7526
B.Br.002	T↔C com	dT	ddC ddG	TGTGTTCTGTTGTTAACGTTACT	6737	(T) 7315	(G) 7051
B.Br.003	G↔A	dA	ddC ddG	AAGCAGATGAGCTTACATATCC	6727	(G) 7041	(A) 7318
B.Br.004	C↔T	dT	ddC	TTGGGTAACCTTCTTACTTCTA	6971	(C) 7244	(T) 7548
A/B. Br.001	A↔G	dG	ddA	ATCGCTGCACTCTTTATTTAG	6666	(A) 6964	(G) 7293

Изучили два варианта удлинения праймера – в реакциях минисеквенирования с набором из всех четырех терминирующих ddNTPs и с набором из определенных dNTPs и ddNTPs в зависимости от контекста нуклеотидных последовательностей в области SNP. В первом случае теоретические различия в молекулярных массах удлинённых праймеров для двух возможных аллелей SNP не превышали 15–30 Да, во втором же варианте они были в пределах от 257 до 993 Да, что повышало дискриминирующие возможности анализа, поэтому предпочли вариант с составом реакционных смесей с набором из определенных dNTPs и ddNTPs (см. табл. 2). Корректность разработанных праймеров и генерируемых в реакции минисеквенирования с данным набором dNTPs аллелей SNP подтвердили проверкой *in silico* в программе BLASTn (NCBI) в сравнении с геномами 38 штаммов из базы GenBank.

Описание разработанного метода. Последовательность операций метода начиналась с выделения ДНК штаммов *B. anthracis*, которую проводили набором «ДНК-сорб-В» в соответствии с инструкцией производителя. Затем следовала ПЦР-амплификация 13 областей генома, содержащих SNP, с выделенной ДНК-матрицей и праймерами, описанными в таблице 1. Реакционные смеси в объеме 25 мкл содержали 5 мкл ×5 ПЦР-буфера, 2,5 мкл ×5 dNTP mix, по 0,2 мкл прямого и обратного праймера с концентрацией 100 пМ, 0,5 мкл ДияТаQ полимеразы, 10 мкл ДНК-матрицы и 6,6 мкл деионизованной воды. ПЦР проводили по программе: 95 °C – 5 мин → (95 °C – 10 с, 58 °C – 20 с, 72 °C – 15 с) – 40 циклов → 72 °C – 3 мин. Следующий этап состоял в очистке продуктов амплификации от не включившихся нуклеозидтрифосфатов. 10 мкл амплификата переносили в ПЦР-пробирку объемом 0,2 мл и смешивали с раствором щелочной креветочной фосфатазы, приготовленной на льду (×10 буфер для щелочной фосфатазы –

2 мкл, щелочная фосфатаза – 1 мкл, деионизованная вода – 7 мкл). Реакцию проводили 30 мин при температуре 37 °C и затем останавливали прогреванием при 90 °C в течение 20 мин. Очищенные таким образом амплификаты использовали для проведения реакции минисеквенирования. В состав реакционных смесей объемом 10 мкл входило 2 мкл ×5 буфера для SNPase ДНК полимеразы, смесь dNTPs и ddNTPs по 2 мкмоль каждого и по 5 пмоль каждого праймера (см. табл. 2), 5 ед SNPase ДНК полимеразы, 5 мкл очищенного амплификата и деионизованная вода до конечного объема. Реакционные смеси центрифугировали 3 мин при 2000 об/мин и проводили реакцию минисеквенирования по программе: 95 °C – 1 мин → (95 °C – 30 с, 59 °C – 30 с, 72 °C – 20 с) – 35 циклов → 72 °C – 5 мин. По окончании минисеквенирования продукты реакции обессоливали катионообменной смолой. В пробирку с 10 мкл продуктов минисеквенирования вносили 20 мкл деионизованной воды и 20 мкл суспензии активированной катионообменной смолы W50-x8. Смесь перемешивали на вортексе в течение 30 мин и центрифугировали 4 мин при 2000 об/мин. Для проведения анализа использовали супернатант.

На следующем этапе готовили матрицу для масс-спектрометрии, растворяя 3-гидроксипиколиновую кислоту до насыщения в 50 % водном растворе ацетонитрила, и раствор цитрат аммония двухосновного из расчета 1 г на 10 мл деионизованной воды. Смешивали 9 объемов раствора 3-гидроксипиколиновой кислоты и 1 объем раствора цитрат аммония двухосновного, перемешивали на вортексе 1–2 мин.

Затем наносили на мишень AncorChip 0,5 мкл матрицы и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Равный объем образца (0,5 мкл) наносили на высушенную матрицу. После высыхания образца мишень помещали в MALDI-TOF масс-спектрометр для анализа.

Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона m/z от 4500 до 12000, используя для определения калибровочных констант масс-спектры пептидов. Каждый масс-спектр олигонуклеотидов получали при 30 накоплениях с постоянной мощностью лазерного излучения на уровне порогового значения для увеличения разрешения. На суммарном масс-спектре фиксировали пик, соответствующий массе праймера, пик, соответствующий массе продукта, и ориентировались также на разницу в их массах (см. табл. 2).

Результаты регистрировали в виде записи буквенных обозначений аллелей всех 13 *can*SNP в том порядке, как они перечислены в таблице 2. Например, полный SNP генотип штамма *B. anthracis* 1295/357, результат определения SNP A.Br.002 которого приведен на рисунке, выглядел следующим образом:

T G A T C T T A T T A T A,

что соответствовало генотипу B.Br.001/002, исходя из предложенных обозначений [8].

Оценка эффективности метода. Воспроизводимость и корректность получаемых результатов проверили троекратным повторением типирования 10 штаммов *B. anthracis*, отобранных по признаку разного географического происхождения, и сравнением их с результатами, полученными методом прямого секвенирования амплификатов с праймерами из таблицы 1, а также методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени с LNA-модифицированными зондами [3]. Во всех случаях получено полное совпадение результатов SNP-генотипирования.

Сравнивая разработанный метод с известными, отметим, что система SNP-генотипирования *B. anthracis* на основе аллель-специфической Real time PCR с флуоресцентными MGB-зондами [8], технология которых в РФ не используется, требует наличия амплификатора для ПЦР в режиме реального времени. Метод SNP-генотипирования *B. anthracis* на основе набора SNaPshot Multiplex Kit

(Applied Biosystems, USA) [1] требует наличия этого набора и автоматического ДНК-анализатора той же фирмы. Это же относится и к методу CUMA (capillary electrophoresis universal-tail mismatch amplification mutation assay) [7]. Поэтому при наличии MALD-TOF масс-спектрометра, универсального прибора для анализа многих макромолекул, включая белки, нуклеиновые кислоты, липиды, предлагаемый метод становится хорошей альтернативой или дополнением других методов SNP-генотипирования.

Заключение. Для определения SNP-генотипов штаммов *B. anthracis* впервые предложен методический подход, состоящий в последовательном использовании минисеквенирования областей генома, содержащих 13 «канонических» единичных нуклеотидных полиморфизмов, и определения аллелей по разнице в величине молекулярных масс секвенированных фрагментов ДНК MALD-TOF масс-спектрометрией.

SNP-генотипирование возбудителя сибирской язвы незаменимо в эпидемиологии как быстрый способ установления принадлежности выделенных в ходе вспышки инфекции штаммов к одной из узловых групп глобального молекулярного разнообразия вида *B. anthracis*. Это дает возможность сделать предварительное предположение о географическом происхождении штамма, исключить интродукцию не эндемичных вариантов и установить или отвергнуть общий источник инфекции.

В теоретических исследованиях SNP-генотипирование позволяет проследить эволюцию сибиреязвенного микроба в целом и в масштабах разных территорий.

Разработанный метод SNP-генотипирования *B. anthracis* имеет преимущества перед другими методами благодаря возможности мультиплексирования анализов, меньшим материальным затратам и, таким образом, может быть полезным в работе профильных микробиологических лабораторий.

Литература

1. Афанасьев, М. В. Сравнительный мультилокусный VNTR и SNP-анализ вакцинных штаммов *Bacillus anthracis* / М. В. Афанасьев, Е. В. Кравец, З. Ф. Дугаржапова [и др.] // Молекулярная генетика микробиология и вирусология. – 2014. – № 2. – С. 36–40.
2. Верещагин, В. А. Использование масс-спектрометрии MALDI TOF для выявления в генах *gyrA* и *parC* *Neisseria gonorrhoeae* однонуклеотидных замен, определяющих формирование устойчивости к фторхинолонам / В. А. Верещагин, Е. Н. Ильина, М. М. Зубков [и др.] // Молекулярная биология. – 2005. – Т. 39, № 6. – С. 923–932.
3. Котенева, Е. А. Анализ *can*SNP генотипов штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных на территории Северного Кавказа и Закавказья / Е. А. Котенева, О. И. Цыганкова, Е. И. Еременко // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – Ставрополь, 2014. – С. 57–58.
4. Afanas'ev, M. V. Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation / M. V. Afanas'ev, L. N. Ikryanikova, E. N. Il'ina [et al.] // J. Antimicrob.

Chemother. – 2007. – Vol. 59. – P. 1057–1064. doi: 10.1093/jac/dkm086

5. Ilina, E. N. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (Mass Spectrometry) for Hepatitis C Virus Genotyping / E. N. Ilina, M. V. Malakhova, E. V. Genozov [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43, № 6. – P. 2810–2815. doi: 10.1128/JCM.43.6.2810-2815.2005
6. Lowe, C. A. A single nucleotide polymorphism identification assay for the genotypic characterization of *Neisseria meningitidis* using MALDI-TOF mass spectrometry / C. A. Lowe, M. A. Diggle, S. C. Clarke // Br. J. Biomed. Sci. – 2004. – Vol. 61, № 1. – P. 8–10.
7. Price, E. P. Cost-effective interrogation of single-nucleotide polymorphisms using the mismatch amplification mutation assay and capillary electrophoresis / E. P. Price, M. A. Matthews, J. A. Beaudry [et al.] // Electrophoresis. – 2010. – Vol. 31, № 23–24. – P. 3881–3888. doi: 10.1002/elps.201000379
8. Van Ert, M. N. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis* / M. N. Van Ert, W. R. Easterday, L. Y. Huynh [et al.] // PLoS ONE. – 2007. – Vol. 2, № 5. – e461. doi: 10.1371/journal.pone.0000461

References

1. Afanas'ev M. V., Kravets E. V., Dugazhapova Z. F., Takaishvili V. E. *Molekulyarnaya genetika mikrobiologii i virusologii*. – *Molecular genetics Microbiology and Virology*. 2014;2:36-40.

2. Vereschagin V. A., Il'ina S. V., Zubkov M. M., Pripitnevich T. V. *Molekulyarnaya biologiya*. – *Molecular biology*. 2005;39(6):923-932.
3. Kotenova E. A., Tsygankova O. I., Eremenko E. I. *Aktualnye problemy epidemiologii i profilakticheskoy*

- meditsiny: Materialy VI Vserossyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchenykh i spetsialistov Rospotrebnadzora. 2014. P. 57–58.
4. Afanas'ev M. V., Ikryannikova L. N., Il'ina E. N., Sidorenko S. V., Kuz'min A. V., Larionova E. E., Smirnova T. G., Chernousova L. N., Kamaev E. Yu., Skorniakov S. N., Kinsht V. N., Cherednichenko A. G., Govorun V. M. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007;59:1057–1064. doi: 10.1093/jac/dkm086
 5. Ilina E. N., Malakhova M. V., Generozov E. V., Nikolaev E. N., Govorun V. M. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(6):2810–2815. doi: 10.1128/JCM.43.6.2810-2815.2005
 6. Lowe C. A., Diggle M. A., Clarke S. C. *Br. J. Biomed. Sci.* 2004;61(1):8–10.
 7. Price E. P., Matthews M. A., Beaudry J. A., Allred J. L., Schupp J. M., Birdsell D. N., Pearson T., Keim P. *Electrophoresis.* 2010;31(23–24):3881–3888. doi: 10.1002/elps.201000379
 8. Van Ert M. N., Easterday W. R., Huynh L. Y., Okinaka R. T., Hugh-Jones M. E., Ravel J., Zanecki S. R., Pearson T., Simonson T. S., U'Ren J. M., Kachur S. M., Leadem-Dougherty R. R., Rhoton S. D., Zinser G., Farlow J., Coker P. R., Smith K. L., Wang B., Kenefic L. J., Fraser-Liggett C. M., Wagner D. M., Keim P. *PLoS One.* 2007;2(5):e461. doi: 10.1371/journal.pone.0000461

Сведения об авторах:

Еременко Евгений Иванович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории сибирской язвы; тел.: (8652)260312, 89614549626; e-mail: ejer@mail.ru

Воропаев Владимир Владимирович, младший научный сотрудник лаборатории постгеномных технологий; тел.: (8652)260312, 89197493123; e-mail: voropaev.7@mail.ru

Котенева Елена Анатольевна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией; тел.: (8652)260312, 89054125473; e-mail: postgenom_stv@mail.ru

Рязанова Алла Геннадьевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией сибирской язвы; тел.: (8652)260312, 89097646158; e-mail: anthraxlab.stv@mail.ru

Аксенова Людмила Юрьевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник; тел.: (8652)260312, 89054192575; e-mail: anthraxlab.stv@mail.ru

Цыганкова Ольга Ивановна, доктор медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник; тел.: (8652)260312, 89054697529; e-mail: anthraxlab.stv@mail.ru

Буравцева Нина Пантелеймоновна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник; тел.: (8652)260312, 89054965463; e-mail: bura-nina@yandex.ru

Куличенко Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор; тел.: (8652)260312, 89624403373; e-mail: kulichenko_an@list.ru

© З. А. Кисиева, В. Б. Брин, 2016
УДК 616-003.821.001.6
DOI – <http://doi.org/10.14300/mnnc.2016.11136>
ISSN 2073-8137

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОФИЛАКТИКА РАЗВИТИЯ МОДЕЛИ АМИЛОИДОЗА У СИРИЙСКИХ ХОМЯКОВ

З. А. Кисиева, В. Б. Брин

Северо-Осетинская государственная медицинская академия, Владикавказ, Россия

EXPERIMENTAL PREVENTION OF AMYLOIDOSIS IN SYRIAN HAMSTERS

Kisieva Z. A., Brin V. B.

North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russia

Целью исследования явилось изучение профилактического влияния милдроната и ацизола с первых дней введения нативной овечьей плазмы на морфофункциональные показатели почек у животных.

Установлено, что одновременное введение ацизола и милдроната опытным животным с первых дней введения нативной овечьей плазмы способствует развитию менее выраженных нарушений, характерных для амилоидной нефропатии, обусловленных меньшим нарушением фильтрационной способности и уменьшением канальцевой реабсорбции воды, значительным повышением экскреции натрия, снижением калий и кальцийуреза, значительным снижением степени протеинурии, а также менее выраженной гистологически подтвержденной картиной повреждения изученных органов, выражающихся в уменьшении накопления амилоида в стромально-сосудистых структурах исследуемых органов (почки, сердце, печень, селезенка).

Ключевые слова: амилоидная нефропатия, калий и кальцийурез, фильтрационная способность почек, канальцевая реабсорбция воды