

ционном периоде была рекомендована медикаментозная терапия: диеногест 2 мг в сутки от 6 месяцев и более.

### **Выводы**

Лечебно-диагностическая лапароскопия является ведущим методом диагностики и лечения наружного генитального эндометриоза. Только при проведении лапароскопии были диагностированы малые формы эндометриоза, инфильтративный, распространенный эндометриоз у женщин, стра-

дающих бесплодием, хронической тазовой болью. Наиболее информативный метод диагностики аденомиоза — трансвагинальное УЗИ. У пациенток в пре- и постменопаузе с аденомиозом и мено-, метроррагиями, при сочетании аденомиоза с миомой матки, а также при хронической тазовой боли операцией выбора была тотальная или субтотальная гистерэктомия. При диффузной форме аденомиоза у женщин репродуктивного возраста рекомендовали консервативную терапию.

## **ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ НК-КЛЕТОК**

© А.А. Жданова, К.Л. Белякова, Т.Е. Тертычная, К.М. Пятыгина, Ю.П. Милютин

ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург

### **Актуальность исследования**

Натуральные киллеры (НК-клетки) являются цитотоксическими клетками, которые активно участвуют в формировании иммунологической толерантности при беременности. Основные белки, осуществляющие их цитотоксическую функцию, известны и уже частично описаны в современной литературе. Однако НК-клетки, в особенности НК-клетки в зоне маточно-плацентарного контакта, участвующие в процессах формирования плаценты, на данный момент представляют интерес для полного протеомного исследования. Клетки линии НК-92, взятые для настоящего исследования, воспроизводят основные фенотипические и функциональные характеристики активированных НК-клеток.

### **Цель исследования**

Исследование белкового профиля клеток линии НК-92 при спонтанном культивировании с помощью масс-спектрометрического анализа после разделения белков методом 2D-электрофореза.

### **Материалы и методы исследования**

Клетки линии НК-92 (ATCC, США) спонтанно культивировали, используя полную ростовую среду на основе минимальной среды Игла  $\alpha$ -модификации ( $\alpha$ -MEME), содержащую 12,5 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 12,5 % инактивированной лошадиной сыворотки, 500 Ед/мл ре-

комбинантного IL-2 («Ронколейкин», Биотех, Россия). Клетки культивировали во влажной атмосфере при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>.

Клетки центрифугировали при 200 g, после чего отмывали от среды фосфатным буфером PBS и замораживали либо в лизирующем буфере RIPA, либо в воде Nanopure Water (Bio-Rad, США). Замороженные в воде клетки разрушали методом замораживания-оттаивания с последующей гомогенизацией. Клетки концентрировали, после чего ресуспендировали в регидратирующем буфере, мембраны отделяли центрифугированием, супернатант отбирали для изоэлектрофокусирования. Определение концентрации общего белка в клетках линии НК-92 проводили методом Лоури.

Для разделения белковой смеси использовался метод двумерного электрофореза. Регидратацию на стрипах Mini-Protean 7 cm IPG strip, pH 3-10 (Bio-Rad, США) проводили в течение 12 часов, изоэлектрофокусирование проходило при 50 В · ч в течение 6 часов. После изоэлектрофокусирования проводили электрофорез второго направления, белки по молекулярной массе разделяли в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия при напряжении 200 В. После электрофореза пятна белковых фракций вырезали и подвергали трипсинизации с использованием трипсина бычьего в 30 мМ Трис (pH 8,2).

Масс-спектрометрический анализ белков проводили на квадруполь-времяпролетном

масс-спектрометре Agilent ESI-Q-TOF 6538 UHD (Agilent Technologies, США), совмещенным с высокоэффективным жидкостным хроматографом Agilent 1260. Анализ масс-спектрометрических данных проводился в программе Spectrum Mill MS Proteomic Workbench с поиском по базе данных UniProt. После идентификации пептидов проверялось соответствие идентифицированного белка его реальному положению на геле.

### **Результаты исследования**

Полученные после разрушения клеток с помощью лизирующего буфера RIPA электрофореграммы оказались недостаточно информативными по сравнению с разрушением клеток с помощью замораживания-оттаивания. Использование лизирующего буфера RIPA затрудняет прохождение изоэлектрофокусирования, особенно в диапазоне pH 8–10, где наблюдалось размывание белковых полос, что указывает на отсутствие нормального прохождения изоэлектрофокусирования в щелочной области. Отсутствие достаточного разделения белков в данном диапазоне pH, в котором, в частности, находятся изоэлектрические точки гранзимов, одних из ос-

новных цитотоксических белков НК-клеток, указывает на трудности, с которыми можно будет столкнуться при проведении исследований по изменению цитотоксичности НК-клеток в присутствии трофобласта. При этом метод замораживания-оттаивания позволил получить адекватную 2D-электрофореграмму протеома НК-клеток с возможностью идентификации и последующего анализа пятен методом масс-спектрометрии.

С помощью метода тандемной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии были идентифицированы белки цитоскелета, ферменты гликолиза и другие белки — участники различных метаболических путей клетки.

### **Выводы**

Метод масс-спектрометрического анализа позволил определить белковый профиль клеток линии НК-92 после их замораживания-оттаивания и дальнейшего разделения белков методом 2D-электрофореза.

Исследование выполнено с использованием оборудования РЦ РМиКТ СПбГУ.

*Работа поддержана грантами РНФ № 17-15-01230 и РФФИ № 17-04-00679*

## **УРОВЕНЬ СЕРОТОНИНА В ТРОМБОЦИТАХ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЗРЕЛОСТИ МОЗГА И ГОТОВНОСТИ К РОЖДЕНИЮ ДОНОШЕННОГО РЕБЕНКА**

© Н.А. Зверева

ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург

### **Актуальность проблемы**

В последние десятилетия наблюдается рост у детей частоты когнитивных, эмоциональных расстройств, нарушений поведения и сна, истоки которых кроются в патологии перинатального периода жизни ребенка и широкого использования оперативного родоразрешения. Ведущую роль в механизмах программирования нервно-психических заболеваний играет серотонинергическая система мозга, нормальное развитие которой определяет процессы дифференцировки нейронов, формирования межнейронных связей и становления циркадных ритмов, то есть готовность ребенка к рождению и адаптации в но-

вых условиях среды. Наиболее доступной и адекватной для оценки состояния серотонинергической системы мозга является модель серотониновой системы тромбоцитов периферической крови, что определяет необходимость изучения содержания серотонина в тромбоцитах новорожденных детей для разработки диагностических критериев патологии.

### **Цель исследования**

Изучить содержание серотонина в богатой тромбоцитами плазме пуповинной крови и тромбоцитах венозной крови доношенных новорожденных детей различного гестационного возраста.