

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЦЕНТР ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ЦТП ФХФ РАН)

УДК 577.3.01 577.38 577.3:51-76
Рег. N НИОКТР АААА-А18-118012390247-0
Рег. N ИКРБС

УТВЕРЖДАЮ

ВРИО директора ЦТП ФХФ РАН

д-р. физ.-мат. наук

 М.А. Пантелеев

20 18 г.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

В рамках Программы фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013-2020 годы

**ВЫЯВЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ
СРЕДЫ, ОБРАЗА ЖИЗНИ И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ВОЗНИКНОВЕНИЮ МУЛЬТИФАКТОРНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ КАК ОСНОВА ПРЕДИКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ
(промежуточный)**

Руководитель НИР,
ВРИО Директора,
д-р. физ.-мат. наук,

 М.А. Пантелеев

Москва 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, ВРИО директора,
д-р.физ.-мат.наук


27.12.18

М.А. Пантелеев
(введение, заключение)

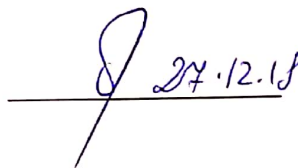
Ответственный исполнитель,
Научный руководитель,
д-р.биол.наук, член-корр. РАН


27.12.18

Ф.И. Атауллаханов
(введение, заключение)

Исполнители:

Зам. директора по науке,
канд.биол.наук

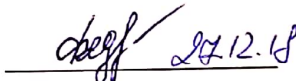

27.12.18

А.Н. Баландина
(нормоконтроль)

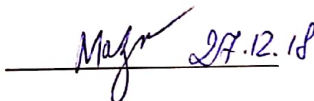
Инженер-исследователь,
д-р.биол.наук

 27.12.18 Ю.И. Наумов
(раздел 1)

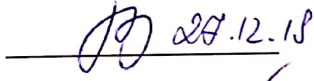
Ст. научн.сотр., канд.биол.наук

 27.12.18 О. Федянина
(раздел 1)

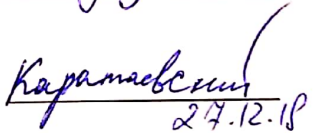
Научн.сотр.

 27.12.18 Ю.И. Мазничка
(раздел 1)

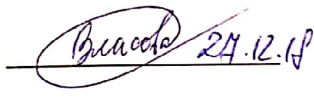
Ст. научн.сотр., д-р.биол.наук

 27.12.18 В.М. Витвицкий
(раздел 1)

Техник

 27.12.18 А.А. Каратаевский
(раздел 1)

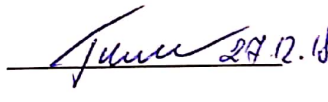
Ст. научн.сотр., канд.биол.наук

 27.12.18 И.М. Власова
(раздел 1)

Зав. Отделом

 27.12.18 И.С. Спиридонов
(раздел 1)

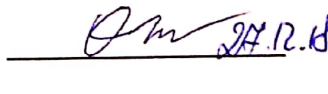
Техник

 27.12.18 В.И. Тимофеев
(раздел 1)

Техник

 27.12.18 С.Р. Шляпина
(раздел 1)

Ведущий инженер

 27.12.18 Ю.О. Осипов
(раздел 1)

Ведущий инженер	<u>Дан 27.12.18</u>	А.Д. Даниелян (раздел 1)
Зав. Отделом	<u>С.Караму 27.12.18</u>	С.С. Карамзин (раздел 2)
Ведущий технолог, канд.биол.наук	<u>Фадеев 27.12.18</u>	О. Фадеева (раздел 2)
Ведущий программист	<u>И.В. 27.12.18</u>	А..В. Иванов (раздел 2)
Научн.сотр.	<u>Д.В. 27.12.18</u>	Д.В. Борсакова (раздел 2)
Вед. научн.сотр., канд.биол.наук	<u>Вуймо 27.12.18</u>	Т.А. Вуймо (раздел 2)
Ст. научн.сотр., канд.биол.наук	<u>А.Н. 27.12.18</u>	А.Н. Хвастунова (раздел 2)
Ст. научн.сотр., канд.фмз.-мат.наук	<u>С.А. 27.12.18</u>	С.А. Кузнецова (раздел 2)
Стажер-исследователь	<u>Е.С. 27.12.18</u>	Е.С. Протасов (раздел 2)
Зав. лабораторией, д-р.мед.наук	<u>А.И. 27.12.18</u>	А.И. Воробьев (раздел 3)
Гл. научн.сотр., д-р.мед.наук	<u>А.С. 27.12.18</u>	А.С. Кабанкин (раздел 3)
Ст. научн.сотр., канд.биол.наук	<u>О.С. 27.12.18</u>	О.С. Кременецкая (раздел 3)
Зав. лабораторией, д-р.мед.наук	<u>И.Д. 27.12.18</u>	И.Д. Ионов (раздел 3)
Гл. научн.сотр., д-р.биол.наук	<u>И.С. 27.12.18</u>	И.С. Николаева (раздел 3)
Гл. научн.сотр., д-р.мед.наук	<u>Л.А. 27.12.18</u>	Л.А. Радкевич (раздел 3)
Техник	<u>С.М. 27.12.18</u>	С.М. Григорьев (раздел 3)

Зав. лабораторией, д-р.мед.наук	<u>Ки 27.12.18</u>	И.М. Корсунская (раздел 4)
Гл. научн.сотр., д-р.мед.наук	<u>Пирюз 27.12.18</u>	А.Л Пирюзян (раздел 4)
Вед. научн.сотр., д-р.мед.наук	<u>Дворян 27.12.18</u>	Е.В. Дворянкова (раздел 4)
Ст. научн.сотр., канд.биол.наук	<u>Турпаев 27.12.18</u>	К.Т. Турпаев (раздел 4)
Мл.научн.сотр.	<u>Мильдзихова 27.12.18</u>	Д.Ф. Мильдзихова (раздел 4)
Ст. научн.сотр., канд.мед.наук	<u>Еден 27.12.18</u>	Е.В. Денисова (раздел 4)
Мл.научн.сотр., канд.биол.наук	<u>Соболев 27.12.18</u>	А.Г. Соболева (раздел 4)
Ст. научн.сотр., канд.биол.наук	<u>Соб 27.12.18</u>	В.В. Соболев (раздел 4)
Мл.научн.сотр., канд.биол.наук	<u>Чепурина 27.12.18</u>	Е.В. Чепурина (раздел 4)

РЕФЕРАТ

Отчет 32 с., 1 кн., 11 рис., 1 табл., 37 источн.

БИОЧИП, ЭРИТРОЦИТ, БИОРЕАКТОР, АММОНИЙ, БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА, САХАРНЫЙ ДИАБЕТ, ДАРМАТОЛОГИЯ

Объект исследования – человеческий организм здоровых индивидов и пациентов с различными патологиями.

Цель работы – выявление и изучение неблагоприятных факторов внешней среды, образа жизни и полиморфизма генов, определяющих предрасположенность к возникновению мультифакторных заболеваний как основа предиктивной медицины.

В рамках темы НИР в 2018 году велись исследования в области заболеваний системы крови (в том числе онкологических заболеваний), болезни Паркинсона, сахарного диабета и дерматологических заболеваний.

Основные научные результаты:

1. Показано, что исследование костного мозга пациентов с подозрением на дизэритропоэтическую анемию с помощью биочипов с иммобилизованными антителами к гликофору а позволяет существенно упростить морфологическую диагностику данного заболевания.
2. Разработано экспериментально-фармакологическое обоснование нового метода противопаркинсонической терапии, заключающегося в сочетанном применении димедрола и никотина. Комбинация «димедрол-никотин» по активности превосходит таковую основного современного противопаркинсонического средства «мадопар».
3. Проведено сравнение различных гипоосмотических методов включения глутаматдегидрогеназы (ГДГ) в эритроциты, с целью создания эффективных эритроцитов-биореакторов (ЭБР) для удаления избыточного аммония из крови. Таким методом оказался метод проточного диализа с использованием диализного патрона.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ	2
РЕФЕРАТ	5
СОДЕРЖАНИЕ	6
ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	8
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	10
1. Заболевания системы крови	10
1.1. Изучение молекулярных, цитогенетических, морфологических основ заболеваний системы крови с целью выявления молекулярно-биологических маркеров, улучшения диагностики, адекватного подбора дифференцированной терапии и мониторинга заболеваний ..	10
1.2. Разработка методов диагностики гематологических заболеваний с помощью клеточных биочипов	11
1.3. Структура питания и онкологическая заболеваемость в европейских и средиземноморских странах	13
2. Новые методы терапии социально-значимых заболеваний	14
2.1. Разработка метода патогенетической терапии моторных нарушений (брадикинезии и ригидности) при болезни Паркинсона	14
2.2. Исследование соединений подавляющих действие цитотоксических факторов на производящие инсулин островковые бета-клетки.	14
3. Эритроциты-переносчики и эритроциты-биореакторы	17
3.1. Разработка эритроцитов-биореакторов с включенными ферментами для удаления избыточного аммония из плазмы крови пациентов с гипераммониемией	17
3.2. Разработка метода включения L-аспарагиназы в эритроциты человека с использованием диализного патрона и создание стерильной процедуры запечатывания	21
4. Дерматологические заболевания	23
4.1. Поиск и изучение молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с дерматологическими и психическими заболеваниями	23
4.2. Изучение генетических аспектов патогенеза хронических дерматозов	24
4.3. Оптимизация фармакотерапии хронических дерматозов в разных возрастных группах	25
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	27
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	29

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ААТ – аланинаминотрансфераза
ВВП – валовый внутренний продукт
ГДГ – глутаматдегидрогеназа
ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
ЭБР – эритроцит-биореактор
cS – каталептоген циклосоматостатин
DH – Double-hit
DPH- димедрол
eIF5A – эукариотический фактор инициации трансляции
FL – фолликулярная лимфома
HGBL – high-grade B-cell lymphoma
HFD – богатая пальмитатом диета
iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота
NCT – никотин
ND – обычная диета
MCV – средний объем эритроцитов
MCH – среднее содержание гемоглобина
MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците

ВВЕДЕНИЕ

Неблагоприятные факторы внешней среды, образа жизни и полиморфизма генов зачастую определяют предрасположенность к возникновению мультифакторных заболеваний. К таким заболеваниям относят онкологические заболевания, нарушения обмена веществ, неврологические заболевания, дерматологические заболевания.

Врожденные дизэритропоэтические анемии – группа редких наследственных заболеваний, характеризующихся неэффективным эритропоэзом и многочисленными морфологическими нарушениями в эритроблестах. Их дифференциальная диагностика требует морфологического исследования популяций клеток костного мозга, которые зачастую присутствуют в незначительных количествах и требуют селективного обогащения. Ранее было показано, что морфологическое исследование малочисленных подгрупп лейкоцитов крови и костного мозга может быть существенно упрощено при использовании клеточного биочипа – прозрачной подложки с иммобилизованными на ней антителами к поверхностным дифференцировочным антигенам лейкоцитов. Целью исследования было проверить данное предположение.

В популяционных исследованиях европейских и средиземноморских стран установлена избирательная чувствительность онкологических заболеваний к изменению внутреннего валового продукта и структуры питания. Известно, что онкологическая заболеваемость в средиземноморских странах ниже, чем в других странах мира, благодаря особой диете, содержащей, в отличие от западной диеты, низкое количество продуктов животного происхождения. Целью исследования было проведение анализа зависимости частот онкологических заболеваний разной локализации в зависимости от внутреннего валового продукта и структуры питания.

Болезнь Паркинсона является одной из наиболее распространенных неврологических патологий и поражает в первую очередь лиц пожилого возраста. Болезнь обусловлена дегенерацией дофаминергических нейронов мозга, причина которой не известна. Существующий метод лечения связан с активацией дофаминергической иннервации за счет введения в организм предшественника дофамина – леводопы. Лечебный эффект леводопы-содержащих препаратов на паркинсонические симптомы, в первую очередь на брадикинезию и ригидность, весьма умеренный. Патогенез развития моторных расстройств при болезни Паркинсона неясен. Целью исследования было разработать модели паркинсонизма на крысах.

Известно, что гибель бета-клеток при аутоиммунном диабете обусловлено действием про-воспалительных цитокинов (интерферон-гамма, интерлейкин-1, фактор некроза опухолей). Природный терпеноид брусатол блокирует ответ бета-клеток на про-воспалительные цитокины. На молекулярном уровне действие брусатола может быть опосредовано избирательным подавлением синтеза белков, которое обусловлено ингибированием модификации гипузином фактора трансляции eIF5A. Целью нашего исследования было определить механизм действия брусатола.

Эритроциты являются практически идеальными объектами для транспорта лекарственных веществ или ферментов. На данном этапе мы занимались разработкой эритроцитов-биореакторов с включенными ферментами для удаления избыточного аммония из плазмы крови пациентов с гипераммониемией и разработкой метода включения L-аспарагиназы в эритроциты человека с использованием диализного патрона и создание стерильной процедуры запечатывания.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Заболевания системы крови

1.1. Изучение молекулярных, цитогенетических, морфологических основ заболеваний системы крови с целью выявления молекулярно-биологических маркеров, улучшения диагностики, адекватного подбора дифференцированной терапии и мониторинга заболеваний

Фолликулярная лимфома (FL) с реаранжировками генов *c-myc*, *Bcl-2* и/или *Bcl-6* характеризуется агрессивным течением, как и Double-hit (DH) В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности (HGBL). Терапия таких лимфом требует интенсивного лечения с дальнейшим использованием высокодозной терапии и ауто-ТГСК.

Появление «вторичного» онкогенного события при FL – реаранжировки с участием гена *c-myc* часто ассоциировано с агрессивным течением заболевания.

DH лимфома сопровождается определёнными генетическими нарушениями, приводящими к активации нескольких онкогенов, одним из которых является *c-myc* (как правило, в сочетании с перестройкой генов *Bcl2* и/или *Bcl6*). Подходы к лечению FL DH четко не определены. Применявшийся стандартно режим R-CHOP-21, не продемонстрировал достаточной эффективности при лечении FL DH.

Проанализированы клинические, цитогенетические, морфологические, иммуногистохимические и прогностические характеристики FL DH (6 пациентов) и HGBL (high-grade B-cell lymphoma) DH (12 пациентов) и результаты пациент-адаптированного лечения. Два случая FL DH расценивались как 3А цитологический тип с бластоидной морфологической картиной (*c-myc* /*Bcl2*), другие два – как 3В тип (*c-myc*/*Bcl6*), другие два случая FL DH имели гистологические признаки трансформации в диффузную В-крупноклеточную лимфому (*c-myc*/*Bcl6*, а также *c-myc*/ *Bcl2*/*Bcl6*). В пяти случаях HGBL DH показаны реаранжировки *c-myc* и *Bcl6*, в семи – *c-myc* и *Bcl2*.

В обеих группах большинство больных имели III-IV стадию заболевания, высокую частоту вовлечения экстранодалных областей (свыше 80%), вовлечения костного мозга (40-55%), высокую активность ЛДГ. Уровень экспрессии Ki-67 при HGBL DH выше, чем при FL DH (93% vs 70%, $p < 0.005$).

В качестве терапии первой линии использована программа R-DA-EPOCH (4 курса), далее в зависимости от противоопухолевого ответа проводилась либо консолидация ещё 2

курсами R-DA-EPOCH (в случае полной или частичной ремиссии), либо терапия второй линии – 2 курса R-DHAP с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК).

Общая и безрецидивная выживаемость при FL DH не превышала таковую при HGBL DH: 9 мес vs 12 мес, $p=0.59$; 7.2 vs 7.5, $p=0.98$.

Таким образом, FL с реаранжировками генов *c-myc*, *Bcl-2* и/или *Bcl-6* характеризуется практически таким же агрессивным течением, как и HGBL DH. Больные FL с реаранжировками генов *c-myc*, *Bcl-2* и/или *Bcl-6* нуждаются в проведении более интенсивного лечения с дальнейшим использованием высокодозной терапии и возможно ауто-ТГСК.

1.2.Разработка методов диагностики гематологических заболеваний с помощью клеточных биочипов

Врожденные дизэритропоэтические анемии – группа редких наследственных заболеваний, характеризующихся неэффективным эритропоэзом и многочисленными морфологическими нарушениями в эритроблестах. Их дифференциальная диагностика требует морфологического исследования популяций клеток костного мозга, которые зачастую присутствуют в незначительных количествах и требуют селективного обогащения. Ранее было показано, что морфологическое исследование малочисленных подгрупп лейкоцитов крови и костного мозга может быть существенно упрощено при использовании клеточного биочипа – прозрачной подложки с иммобилизованными на ней антителами к поверхностным дифференцировочным антигенам лейкоцитов. При инкубации суспензии лейкоцитов с биочипом, клетки специфически связываются в тех областях биочипа, где иммобилизованы антитела к присутствующим на их поверхности антигенам. После отмывки биочипа от неспецифически связавшихся клеток на биочипе остаются области, заполненные клетками, несущими определенный поверхностный антиген. Было также показано, что после высушивания и окрашивания по Паппенгейму связавшиеся с биочипом лейкоциты, выделенные из периферической крови или пунктата костного мозга, морфологически идентичны лейкоцитам того же типа, исследуемым в мазках. Гликофорин А присутствует на созревающих эритроидных клетках, начиная со стадии проэритроблеста. Исследование клеток, связавшихся на биочипе с антителом к гликофоруину А, позволяет исследовать чистую популяцию эритроидных предшественников и упрощает выявление морфологических

изменений, характерных для различных типов дизэритропоэтической анемии. Исследование морфологии эритроидных предшественников на биочипе после окраски по Паппенгейму было проведено для трех пациентов мужского пола с подозрением на дизэритропоэтическую анемию в возрасте от 1 до 13 лет. Всем трем пациентам был поставлен диагноз «наследственная гемолитическая анемия неуточненная». В качестве контроля были использованы образцы пунктатов костного мозга 4 здоровых доноров в возрасте от 10 до 43 лет (3 м, 1 ж). Среди эритроидных предшественников всех исследованных пациентов присутствовали мегалобластоидные эритробласты, кроме того, у одного из пациентов были обнаружены митозы на стадии полихроматофильного нормобласта и отдельные двуядерные эритробласты. Мегалобластоидность и митозы на поздних стадиях развития эритроидных предшественников встречаются при различных нарушениях эритропоэза, а количество двуядерных эритробластов ни у одного из пациентов не превышало 1%. Морфологическая картина эритрокариоцитов исследованных пациентов не соответствует врожденной дизэритропоэтической анемии (Рис. 1).

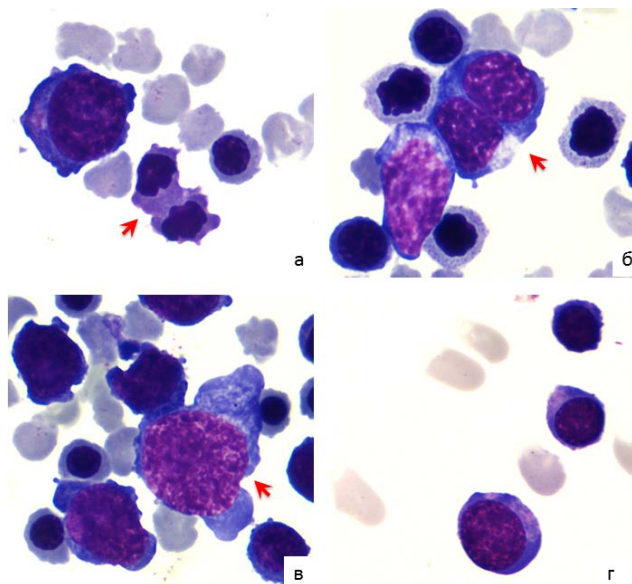


Рис. 1. Морфология эритроидных предшественников на клеточном биочипе. (а-в) морфологические изменения в эритроидных предшественниках, выделенных из костного мозга пациента, поступившего с подозрением на дизэритропоэтическую анемию и связавшегося на биочипе с анти-CD235а (окончательный диагноз – наследственная гемолитическая анемия неуточненная): митоз на стадии полихроматофильного эритрокариоцита (а), двуядерный базофильный эритробласт (б), мегалобласт (в); (г) нормальные эритроидные предшественники. Патологические изменения указаны стрелками.

1.3. Структура питания и онкологическая заболеваемость в европейских и средиземноморских странах

В популяционных исследованиях европейских и средиземноморских стран установлена избирательная чувствительность онкологических заболеваний к изменению ВВП и структуры питания.

Известно, что онкологическая заболеваемость в средиземноморских странах ниже, чем в других странах мира, благодаря особой диете, содержащей, в отличие от западной диеты, низкое количество продуктов животного происхождения.

Проведен анализ зависимости частот 24 типов онкологических заболеваний разной локализации в 17 европейских и 17 средиземноморских странах в зависимости от ВВП (внутренний валовый продукт) и структуры питания.

С помощью критерия U- Манна-Уитни установлено: если в европейских странах ВВП в 2, 4 или 6 раз выше ВВП средиземноморских стран, то частоты 10 типов рака из 24, главным образом, гормонозависимые, в 1,5-5,0 раз выше, чем в средиземноморских странах. Частоты 14 типов рака из 24 не имеют отличий между европейскими и средиземноморскими странами. Различия частот 10 типов рака, по-видимому, обусловлены структурой питания, состав которой меняется в соответствии с ростом ВВП. С увеличением ВВП в 2, 4 или 6 раз в структуре питания европейских стран растет доля продуктов животного происхождения и алкогольных напитков, и снижается доля овощей, зерновых и фруктов.

Вывод: Для 10 типов рака из 24, европейская структура питания является фактором риска рака. Для 14 типов рака из 24, частоты которых не изменяются пропорционально росту ВВП в европейских странах, структура питания, по-видимому, не является фактором риска рака.

10 типов рака, ассоциированных с величиной ВВП и структурой питания: рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак тела матки, рак почки, лейкемия, меланома, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак яичка.

14 типов рака, частоты которых не зависят от величины ВВП и структуры питания: рак шейки матки, рак глотки, рак губы ротовой полости, рак легкого, рак пищевода, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак желчного пузыря, лимфома Ходжкина, саркома Капрши, рак печени, рак носоглотки, рак щитовидной железы.

2. Новые методы терапии социально-значимых заболеваний

2.1. Разработка метода патогенетической терапии моторных нарушений (брадикинезии и ригидности) при болезни Паркинсона

Исследована чувствительность циклосоматостатин-индуцированной каталепсии у крыс к ограничению сна и к никотину; результаты подтверждают предсказующую способность этой модели и ее патогенетическую обоснованность как модели паркинсонизма. Установлена важная роль мозгового ядра locus coeruleus в патогенезе циклосоматостатин-индуцированного паркинсонизма у крыс. Выявлен синергизм противопаркинсонического действия димедрола и никотина. Комбинация «димедрол-никотин» по активности превосходит таковую основного современного противопаркинсонического средства «мадопар». На двух видах животных обоснована целесообразность проведения клинических испытаний противопаркинсонического действия комбинации «димедрол-никотин» (Рис. 2).

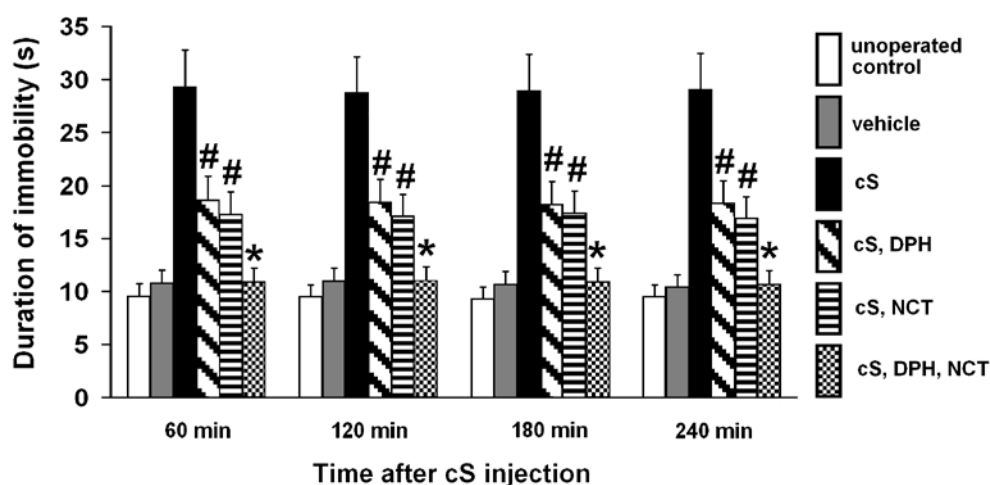


Рис. 2. Синергизм противокаталептического действия димедрола и никотина у крыс. cS – каталептоген циклосоматостатин; DPH- димедрол; NCT – никотин.

2.2. Исследование соединений подавляющий действие цитотоксических факторов на производящие инсулин островковые бета-клетки.

В экспериментах на животных, содержащихся на обогащенной жирными кислотами диете показано, что брусатол предотвращает происходящие в этих условиях патологические процессы: нарушение переносимости глюкозы и снижение чувствительности к инсулину. На молекулярном уровне действие брусатола может быть опосредовано избирательным

подавлением синтеза белков, которое обусловлено ингибированием модификации гипузином фактора трансляции eIF5A.

Брусатол представляет собой относящееся к циклическим терпеноидам природное соединение, имеющее множественные фармакологические эффекты. В частности, согласно нашим ранее полученным данным, брусатол предотвращает гибель бета-клеток под действием про-воспалительных цитокинов. В последних исследованиях мы показали, что брусатол предотвращает нарушение гомеостаза глюкозы, вызванное диетой с высоким содержанием пальмитиновой кислоты (Рис. 3). В частности, брусатол заметно снижает нарушение переносимости глюкозы и снижение чувствительности к инсулину в тканях периферических по отношению к производящий инсулин поджелудочной железе. В самих бета-клетках брусатол ингибирует уникальную модификацию гипузином и активность фактора инициации трансляции eIF5A и, как следствие, вызванный цитокинами рост экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS). Полученные данные указывают на то, что высокая активность eIF5A, обусловленная гипузиновой модификацией этого фактора, необходима для развития множественных функциональных нарушений, вызванных высоким потреблением ненасыщенных жирных кислот (Рис. 4). Используемая нами экспериментальная модель воспроизводит ранние фазы развития диабета 2-го типа.

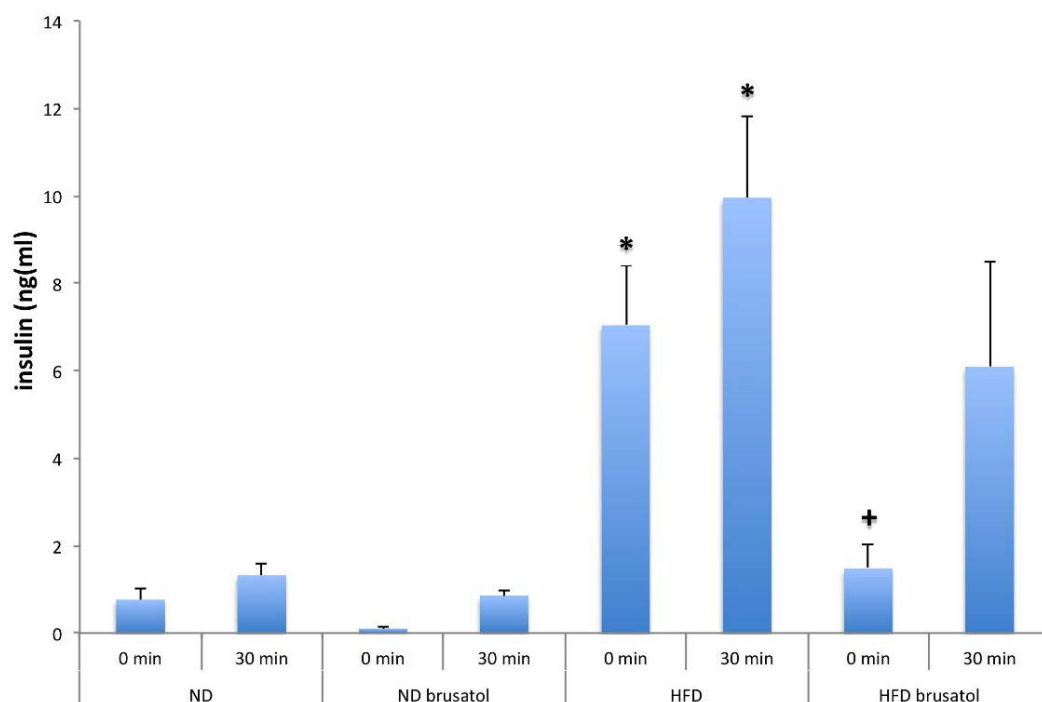


Рис. 3. Брусатол снижает рост уровня глюкозы в крови мышей, содержащихся на диете с высоким содержанием пальмитиновой кислоты. Содержание инсулина в крови мышей линии C57BL/6 определяли до и через 30 мин после инъекции глюкозы (2,5 г/кг веса). Животные в течение 13 недель содержались на диете с обогащенной жирными кислотами. Брусатол (1 мг/кг) давался животным вместе с питьевой водой в течение последних 2 недель до начала эксперимента. HFD – диета с высоким содержанием жирных кислот. ND – без диеты. $P < 0,05$ (ANOVA) относительно значений в группе ND (*) или HFD без обработки брусатолом (+).

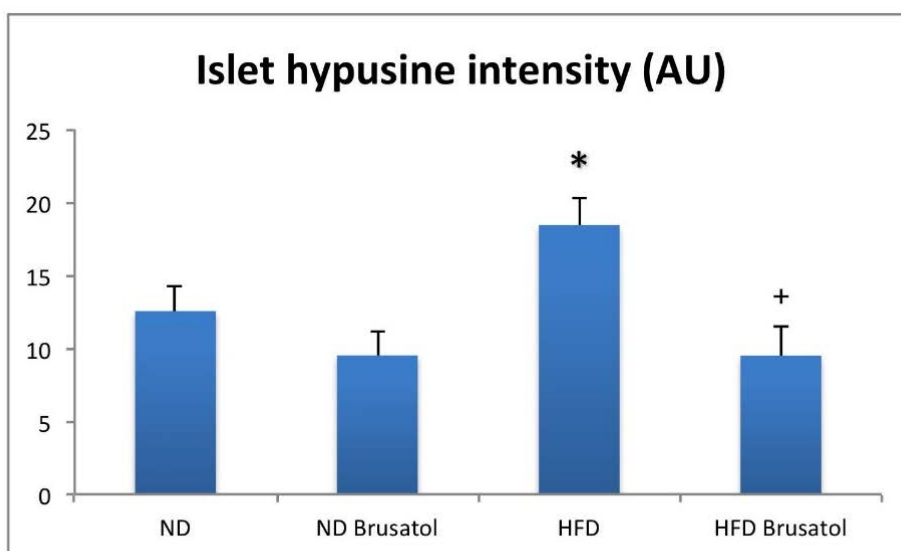


Рис. 4. Брусатол предотвращает рост уровня гипузинирования в эндокринных клетках поджелудочной железы животных, содержащихся на диете обогащенной пальмитиновой кислотой. Приведены данные иммуногистохимического анализа содержания, модифицированного гипузином фактора инициации транскрипции eIF5A в производящих инсулин клетках животных, содержащихся на обычной (ND) и богатой пальмитатом (HFD) диетах. Условия эксперимента такие же как и на Рис. 1. $P < 0,05$ относительно группы ND в присутствии (+) и без брусатола (*) (критерий Стьюдента). AU, относительные единицы.

3. Эритроциты-переносчики и эритроциты-биореакторы

3.1. Разработка эритроцитов-биореакторов с включенными ферментами для удаления избыточного аммония из плазмы крови пациентов с гипераммониемией

Ранее с помощью математического моделирования мы показали, что наиболее перспективным для создания ЭБР, удаляющих аммоний (аммоцитов), является совместное включение в эритроциты ГДГ и аланинаминотрансферазы (ААТ). Однако эффективность таких ЭБР лимитируется низкой активностью ГДГ, которая может быть включена в клетки. Это обусловлено высокой молекулярной массой данного фермента (332 кДа), низкой удельной активностью коммерческого препарата ГДГ из печени быка, а также его способностью обратимо агрегировать при повышении концентрации фермента в суспензии выше 0,1 мг/мл. Для ААТ таких проблем не существует. Оптимальными методами для включения ферментов в эритроциты в настоящее время считаются методы обратимого

гипоосмотического воздействия на клетки, в результате которых в мембранах эритроцитов образуются поры, через которые в клетку заходит включаемый фермент. Затем осмотичность раствора возвращают к нормальному уровню, что приводит к закрытию пор и запечатыванию фермента внутри эритроцита. Для выбора наиболее оптимального метода включения ГДГ в эритроциты было проведено сравнение трех различных вариантов гипоосмотического метода включения: метода обратимого гипоосмотического лизиса, метода диализа с использованием диализных мешков и нового метода проточного диализа с использованием диализного патрона, который был разработан нами для включения ГДГ впервые. Для проведения включения ГДГ в эритроциты методом проточного диализа нами были разработаны малые по размеру диализаторы, а также отработаны условия включения (скорости насосов, осмоляльность гипоосмотического буфера, температуры и т.д.). Были измерены процент включения фермента, а также выход эритроцитов при проведении каждой процедуры. Кроме того, были исследованы свойства аммоцитов, получаемых каждым из этих методов (измерены их кривые осмотической резистентности (Рис. 5) и стандартные эритроцитарные индексы (Рис.6)). Было показано (Рис. 7), что наиболее эффективное включение фермента достигается с помощью метода проточного диализа (примерно в 2 раза выше, чем для метода диализа в мешках). При этом выход клеток сохраняется высоким, а свойства получаемых ЭБР (их стандартные эритроцитарные индексы и осмотическая резистентность) позволяют надеяться, что данные ЭБР должны быть хорошо деформируемы, т.е. будут достаточно легко проходить через узкие капилляры, что обеспечит их хорошую выживаемость в организме.

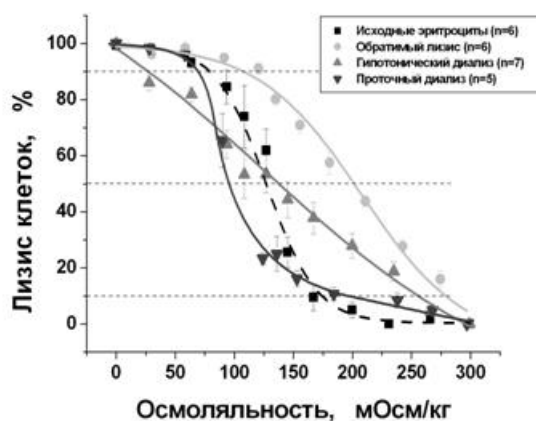


Рис. 5. Кривые осмотической резистентности исходных эритроцитов и фармакоцитов, полученных тремя различными методами. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего; n – количество экспериментов.

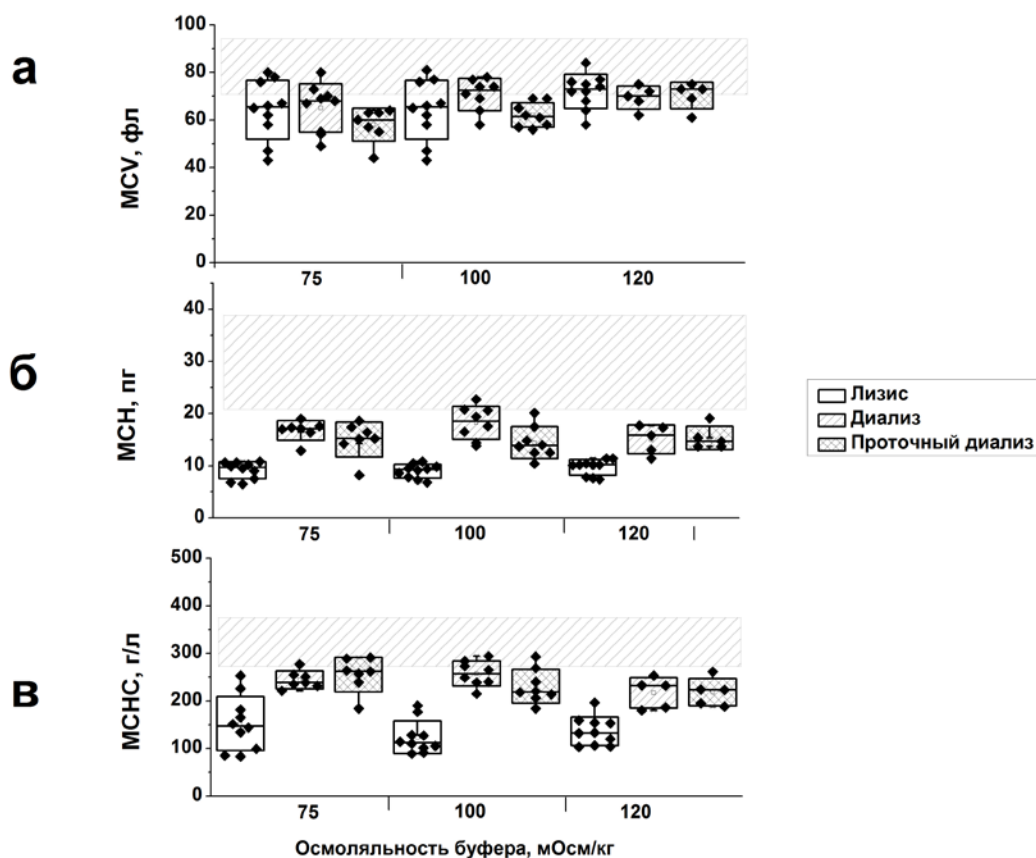


Рис. 6. Зависимость среднего объема эритроцитов (MCV) (а), среднего содержания гемоглобина (MCH) (б) и средней концентрации гемоглобина в эритроците (MCHC) (в) от осмоляльности гипоосмотического буфера при включении фермента в клетки методами лизиса, диализа в мешках или проточного диализа. Заштрихованные области соответствуют диапазонам соответствующих значений для исходных эритроцитов до начала процедуры. Размеры боксов соответствуют области значений, включающей от 25 до 75 перцентилей всех измеренных величин. Для каждого бокса представлены также среднее арифметическое значение (отмечено квадратом), медиана (горизонтальная линия) и разброс между минимальным и максимальным значениями (вертикальные линии).

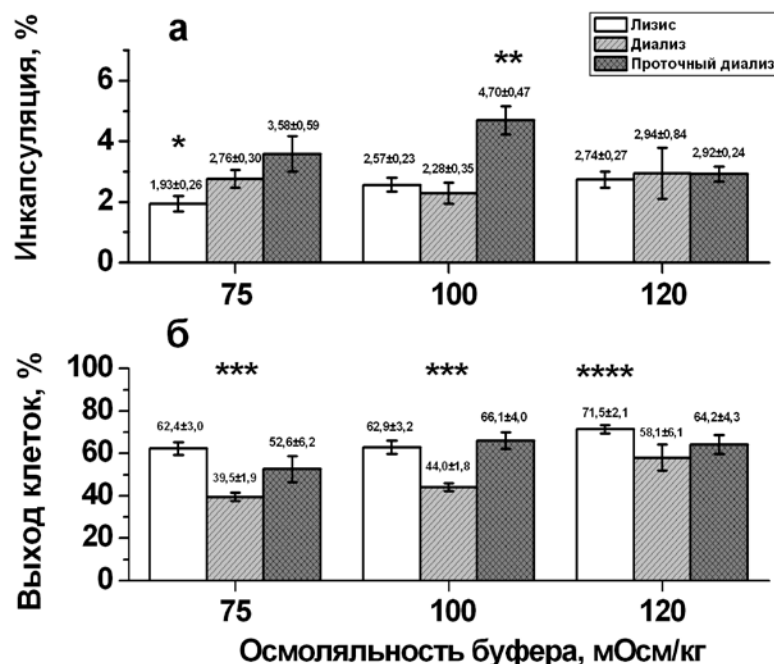


Рис. 7. Зависимость эффективности инкапсуляции ГДГ из печени быка (а) и выхода эритроцитов (б) от осмоляльности гипоосмотического буфера при включении фермента в эритроциты тремя различными гипоосмотическими методами (лизис, диализ в мешке, проточный диализ). Число экспериментов $n=10$ и $n=7$ для всех осмоляльностей в случае лизиса или диализа, соответственно. Для проточного диализа $n=8$ (при 75 мОсм/кг), $n=9$ (при 100 мОсм/кг) и $n=5$ (при 120 мОсм/кг). Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. * - Среднее значение процента инкапсуляции достоверно отличается от значения, полученного для метода лизиса при 120 мОсм/кг и от полученного для метода проточного диализа при 75 мОсм/кг (ANOVA, $p<0,05$). ** - Среднее значение инкапсуляции достоверно отличается от всех остальных, кроме полученного для проточного диализа при 75 мОсм/кг (ANOVA, $p<0,05$). *** - Среднее значение выхода клеток достоверно отличается от выходов клеток, полученных другими методами при тех же осмоляльностях, и от полученного методом диализа при 120 мОсм/кг (ANOVA, $p<0,05$). **** - Среднее значение выхода клеток достоверно отличается от выхода клеток, полученных методом лизиса при других осмоляльностях буфера, а также методом диализа при 120 мОсм/кг (ANOVA, $p<0,05$).

3.2.Разработка метода включения L-аспарагиназы в эритроциты человека с использованием диализного патрона и создание стерильной процедуры запечатывания

Препарат L-аспарагиназы является неотъемлемой частью комплексной терапии острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ). Однако прямое внутривенное введение препарата фермента имеет существенные недостатки. В первую очередь, такое введение вызывает развитие сильных аллергических реакций гиперчувствительности (вплоть до комы и смерти). Кроме того, время жизни такого препарата в организме ограничено из-за существующих в плазме протеаз, способных разрушить фермент, а также из-за возникновения соответствующих антител, которые сильно снижают эффективность препарата при его последующих введениях. Альтернативой стандартной форме введения L-аспарагиназы в виде раствора фермента, является введение L-аспарагиназы внутри эритроцитов-биореакторов. Ранее нами были отработаны все ступени получения такого препарата. Настоящая стадия работы была посвящена отработке получения стерильного препарата L-аспарагиназы в эритроцитах, который уже можно было бы использовать в клинике. В результате работы создана установка (Рис. 8) и отработан алгоритм для стерильной процедуры получения ЭБР, содержащих аспарагиназу. Показано, что разработанный метод способен обеспечить активность фермента внутри клеток, которая достаточна для клинического использования данных ЭБР (Рис. 9).



Рис. 8. Собранная в ламинаре установка для стерильного поведения процедуры проточного диализа для включения L-аспарагиназы в эритроциты. Суспензия эритроцитов прокачивается через диализный патрон перистальтическим насосом сверху вниз (при этом она постоянно перемешивается в исходном мешке с помощью специального шейкера). Гипоосмотический буфер прокачивается другим перистальтическим насосом в противоположном направлении (снизу вверх). Отработанные растворы и получающиеся диализованные эритроциты собираются в специальные контейнеры.

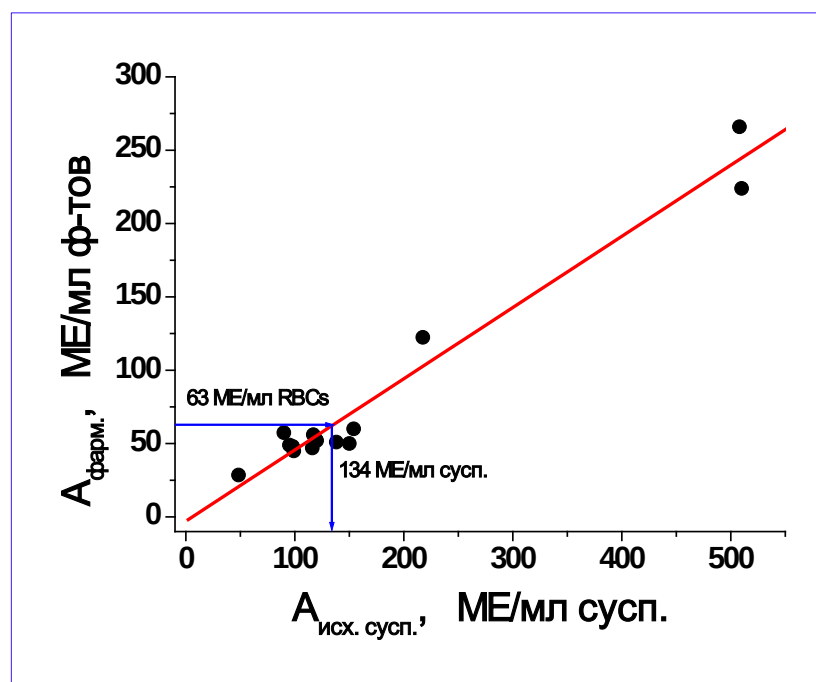


Рис. 9. Зависимость активности L-аспарагиназы, получаемой внутри ЭБР (фармакоцитов) от активности фермента в исходной суспензии клеток. Черными точками отмечены соответствующие активности, полученные экспериментально при различных концентрациях аспарагиназы в исходной суспензии. Синими стрелками отмечена необходимая удельная активность фермента в ЭБР (и соответствующая активность в исходной суспензии эритроцитов), которых надо достигнуть чтобы приготовить дозу препарата для введения ребенку весом 10 кг из расчета 150 МК/кг (1500 ME), при условии, что для приготовления ЭБР у него будет взято 100 мл крови (с гематокритом 40%) и выход клеток в ходе процедуры включения фермента составит 60%.

4. Дерматологические заболевания

4.1. Поиск и изучение молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с дерматологическими и психическими заболеваниями

В ходе исследования сложного взаимодействия генетических и эпигенетических изменений генов, ассоциированных с патологической тревожностью, в патогенезе псориаза решался ряд задач по определению круга генов связанных с паническими расстройствами и тревожностью и отбору функционально значимых аллельные варианты. Так нами обнаружено, что аллель Т замены Т>С в гене MIR22, связанная с псориазом и

демонстрирующая рецессивное наследование (табл.1), также ассоциирована с паническими расстройствами.

Полученные частоты генотипов показаны в табл. 1. Анализ частот сочетаний генотипов выявил достоверную связь между генотипом ТТ и псориазом. Для аллеля Т была показана рецессивная модель наследования.

Таблица 1. Частоты генотипов SNV rs6502892 у пациентов с псориазом и контрольных образцов и результаты ассоциативного исследования.

Генотипы	Пациенты	Контроль	F(p)	ОШ	ДИ95%
ТТ	34.8%	20.6%	0.030	2.05	1.04-3.99
СС+СТ	65.2%	79.4%		0.49	0.25-0.96

F(p) – двусторонний тест Фишера, p-value, ОШ – отношение шансов, ДИ95% – доверительный интервал 95%.

4.2.Изучение генетических аспектов патогенеза хронических дерматозов

Нами изучена роль генов матриксных металлопротеиназ при выраженном развитии склеродермических изменений у пациентов с диагнозом локализованная склеродермия. Был проведен анализ уровня экспрессии генов матриксных металлопротеиназ у пациентов с ограниченной бляшечной формой заболевания и распространенной бляшечной формой склеродермии. Было показано достоверное снижение уровней экспрессии генов матриксных металлопротеиназ во всех изучаемых группах. Разделив пациентов с диагнозом склеродермия на две группы с ограниченной бляшечной формой и распространенной бляшечной формой, и обобщив экспрессионные данные в каждой группе, мы получили довольно интересный результат. Экспрессия гена MMP-1 в пораженной коже пациентов с ограниченной формой заболевания была достоверно снижена в 5,3 раза, а в пораженной коже пациентов с распространенной формой заболевания была достоверно снижена в 11 раз относительно визуально непораженной склеродермией кожи (Рис. 10). Примечательно, что экспрессионные данные этих двух групп достоверно отличаются друг от друга, и это указывает на то, что пациенты с распространенной формой заболевания отличаются более низким уровнем экспрессии гена MMP-1.

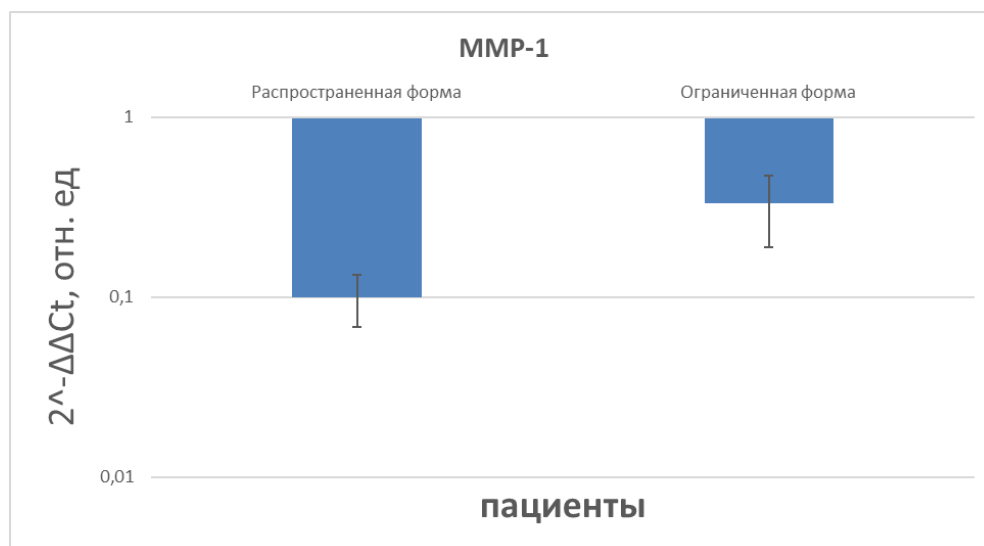


Рис. 10. Сравнение уровня экспрессии мРНК гена MMP-1 в пораженной коже пациентов с диагнозом локализованная склеродермия с ограниченной и распространенной формой заболевания. В качестве контроля использовали уровень экспрессии в визуально непораженной склеродермией коже, принятый за 1.

4.3. Оптимизация фармакотерапии хронических дерматозов в разных возрастных группах

Нами изучены подходы к терапии псориаза у пациентов с гепатопатологиями. Обосновано применение в комплексной терапии гепатопротекторов, в частности препараты, содержащие глицирризированную кислоту и эссенциальные фосфолипиды. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени нами проведен сравнительный анализ уровней экспрессии генов MMP1, MMP9, S100A7, ИЛ-17 и ИЛ-6 в пораженной и визуально не пораженной псориазом коже, до и после проведения комплексной терапии с гепатопротектором. Анализ профилей экспрессии РНК проводился по 40 образцам кожи, взятых у десяти пациентов. На первом этапе анализировались биоптаты из участков кожи, пораженной псориатическим процессом, и непораженной кожи у одних и тех же пациентов. На втором этапе изучались образцы кожи пациентов, проходивших курс гепатопротекторной терапии. После лечебного воздействия наблюдалось достоверное изменение экспрессии всех анализируемых генов. Достоверность отличий между выборками (до и после лечения) составила $p < 0,01$. Показано, что примененная схема лечения существенно изменяет уровень экспрессии изучаемых генов в пораженной коже (рис. 11).

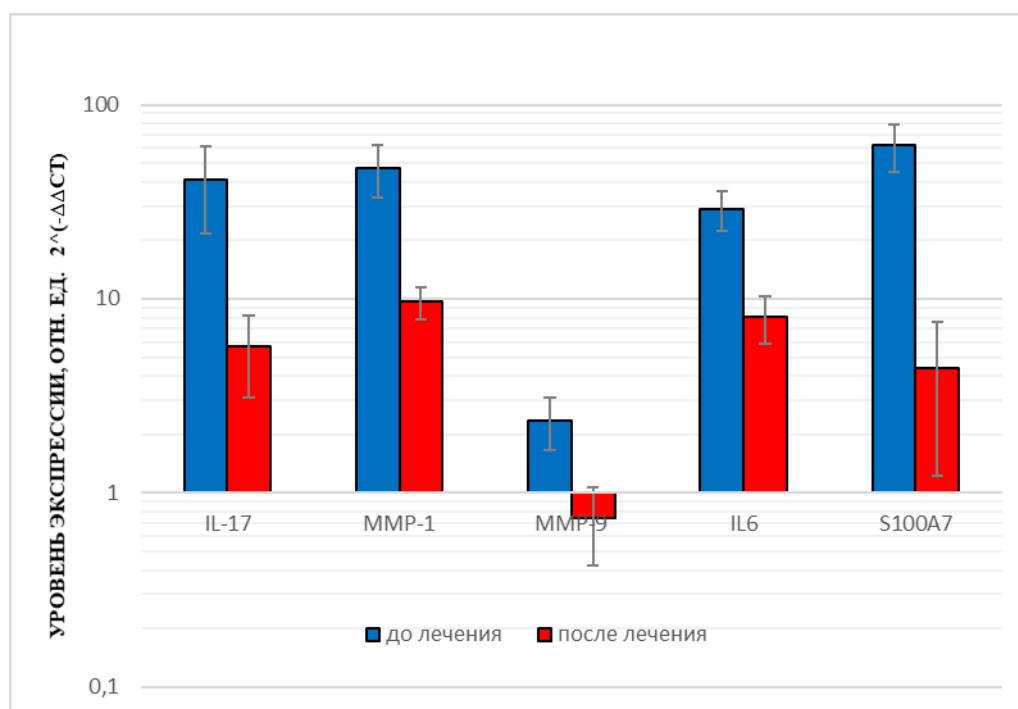


Рис. 11. Сравнение уровня экспрессии генов MMP-1, MMP-9, ИЛ-17, ИЛ-6 и S100A7 непараметрическим методом Манна – Уитни в образцах пораженной псориазом кожи до и после лечения Фосфогливом ($p < 0,01$). За 1 принят уровень экспрессии в визуально не пораженной коже.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Больные с фолликулярной лимфомой с реаранжировками генов *c-myc*, *Bcl-2* и/или *Bcl-6* нуждаются в проведении более интенсивного лечения с дальнейшим использованием высокодозной терапии и возможно ауто-ТГСК.
2. Показано, что исследование костного мозга пациентов с подозрением на дисэритропоэтическую анемию с помощью биочипов с иммобилизованными антителами к гликофору а позволяет существенно упростить морфологическую диагностику данного заболевания.
3. Выявлены ассоциированные со структурой питания и валовым внутренним продуктом типы раков (рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак тела матки, рак почки, лейкемия, меланома, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак яичка), а также не ассоциированные (рак шейки матки, рак глотки, рак губы ротовой полости, рак легкого, рак пищевода, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак желчного пузыря, лимфома Ходжкина, саркома Капрши, рак печени, рак носоглотки, рак щитовидной железы).
4. Разработано экспериментально-фармакологическое обоснование нового метода противопаркинсонической терапии, заключающегося в сочетанном применении димедрола и никотина. Комбинация «димедрол-никотин» по активности превосходит таковую основного современного противопаркинсонического средства «мадопар».
5. Разработана экспериментальная модель, которая воспроизводит ранние фазы развития диабета 2-го типа.
6. Проведено сравнение различных гипоосмотических методов включения глутаматдегидрогеназы (ГДГ) в эритроциты, с целью создания эффективных эритроцитов-биореакторов (ЭБР) для удаления избыточного аммония из крови. Таким методом оказался метод проточного диализа с использованием диализного патрона.
7. Полностью отработана стерильная процедура включения L-аспарагиназы в эритроциты человека с помощью педиатрического диализного патрона. Идет подготовка к ограниченным клиническим испытаниям препарата L-аспарагиназы в эритроцитах для испытания их безопасности и фармакокинетики при терапии острого лимфобластного лейкоза у детей.

8. Обнаружено, что аллель Т замены Т>С в гене MIR22, связанная с псориазом и демонстрирующая рецессивное наследование, также ассоциирована с паническими расстройствами.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Воробьев А.И., Бриллиант М.Д. Лимфоцитома селезенки и классификация лимфоцитом. Терапевтический архив 1982;8:8–14. [Vorob'ev A.I., Brilliant M.D. Spleen lymphocytoma and Lymphocytomas classification. Terapevticheskiy arkhiv =Therapeutic Archive 1982;8:8–14.(In Russ.)].
2. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. М. – Тверь: Триада, 2011. [Lugovskaya S.A., Pochtar' M.E. Hematologic Atlas. Moscow – Tver:Triada, 2011 (In Russ.)].
3. Bain B.J. Leukemia Diagnosis. 4th Ed.Singapore: Wiley-Blackwell, 2010.
4. Julhakyan U., Magomedova A., Kravchenko S. et al. Splenic marginal zone lymphoma: characteristics and treatment. Haematologica 2011;96(S2):393–4.
5. Shao H., Calvo K.R., Grönborg M. et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: Development and validation of diagnostic criteria. Leuk Res 2013;37:401–9. DOI: 10.1016/j.leukres.2012.11.021. PMID: 23347903.
6. Robak T. Hairy-cell leukemia variant: recent view on diagnosis, biology and treatment. Cancer Treat Rev 2011;37(1): 3–10. DOI: 10.1016/j.ctrv.2010.05.003. PMID: 20558005.
7. Traverse-Glehen A., Baseggio L., Callet-Bauchu E. et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? Blood 2008;111:2253–60. DOI: 10.1182/blood-2007-07-098848. PMID: 18042795.
8. Ковригина А.М., Коржова С.М., АльРади Л.С. и др. Патоморфологическая диагностика диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки. Клиническая онкогематология 2016;9(3):287–95. [KovriginA.M., Korzhova S.M., Al-Radi L.S. et al. Pathomorphological diagnosis of splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma. Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2016;9(3):287–95. (In Russ.)]. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-287-295.
9. Аль-Ради Л.С., Моисеева Т.Н., Джулакян У.Л. и др. Опыт изучения лимфомы красной пульпы селезенки. Терапевтический архив 2016;88(2):78–80. [AlRadi L.S., Moiseeva T.N., Julhakyan U.L et al. Experience in investigating splenic red pulp lymphoma. Terapevticheskiy Arkhiv = Therapeutic Archive 2016;88(2):78–80. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/terarkh201688453-60. PMID: 27070164.

10. Julhakyan H.L., Al-Radi L.S., Moiseeva T.N. et al. A single-center experience in splenic diffuse red pulp lymphoma diagnosis. Clin. Lymphoma Myeloma Leuk 2016; 16 (S1):166–9. DOI: 10.1016/j.clml.2016.03.011. PMID: 27131623.
11. Berger F., Felman P., Thieblemont C. et al. Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. Blood 2000;95(6):1950–6. PMID: 10706860.
12. Matutes E., Morilla R, Owusu-Ankomah K. et al. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. Blood 1994; 83(6):1558–62. PMID: 8123845.
13. Джулакян У.Л., Гриншпун Л.Д. Селезеночная лимфома из клеток маргинальной зоны (лимфоцитомы селезенки) у пожилых пациентов: клиника, диагностика, лечение. В кн.: Гериатрическая гематология. Заболевания системы крови в старших возрастных группах. Т. 2. Под ред. Л.Д. Гриншпун, А.В. Пивника. М.: Медиум, 2012. С. 237–44. [Julhakyan U.L., Grinshpun L.D. Splenic lymphoma from marginal zone cells (spleen lymphocytoma) in elderly patients: symptoms, diagnosis, treatment. In: Geriatric hematology. Blood diseases in elderly patients. Eds.: L.D. Grinshpun, A.V. Pivnik. Moscow: Medium, 2012. Vol. 2. Pp. 237–44. (In Russ.)].
14. Shmatova Yu.E., Morev M.V . Assessing the Level of Happiness: a Review of Russian and Foreign Research. Economic and social changes: facts, trends, forecast,3(39)2015,142-169
15. The Happy Planet Index: 2012 Report. A global index of sustainable well-being [Электронный ресурс] / S. Abdallah, J. Michaelson, S. Shah, L. Stoll and N. Marks. – United Kingdom, London, 2012.
16. Layard R. Schast'e: uroki novoi nauki [Happiness: Lessons from a New Science]. Moscow: Publishing House of the Institute of Gaidar, 2011.
17. Easterlin R.A. Does Economic Growth Improve the Human Lot? Some Empirical Evidence, 1974
18. Diener E. Rising Income and the Subjective Well-Being of Nations. Journal of Personality 2013, pp. 267-276.
19. Easterlin R.A. The Happiness-Income Paradox Revisited. Proceedings of the National and Social Psychology, vol 104 (2), February

20. Radkevich LA, Piruzyan LA, Nikolaeva IS, Kabankin AS, Sintsov AV, Gulazizova KS, Radkevich DA. Cancer and environmental factors. //Dokl Biol Sci. 2013 May;450:149-54. Epub 2013 Jul 3.
21. William B. Grant A Multicountry Ecological Study of Cancer Incidence Rates in 2008 with Respect to Various Risk-Modifying Factors Nutrients. //2014 Jan; 6(1): 163–189. Published online 2013 Dec 27. doi: 10.3390/nu6010163
22. Radkevich LA, Radkevich DA. The dietary patterns are a modifying risk factor for breast cancer: An ecological study.// Dokl Biol Sci. 2017 Jan;472(1):21-27. doi: 10.1134/S0012496617010070. Epub 2017 Apr 21.
23. Chetty R1, Stepner M, Abraham S, Lin S, Scuderi B4, Turner N, Bergeron A, Cutler D. The Association Between Income and Life Expectancy in the United States, 2001-2014. JAMA. 2016 Apr 26;315(16):1750-66. doi: 10.1001/jama.2016.4226.
24. Anisimov VN, Borisenkov M.F. Economic and climatogeographic life and morbidity of malignant novelties in men //Oncology Issues / 2012, Vome 58, No. 2. p. 175-180
25. Davis GE, Lowell WE Peaks of solar cycles affect the gender ratio.//MedHypotheses. 2008Dec;71(6):829-38.doi: 10.1016/j.mehy.2008.07.020. Epub 2008 Aug 27.
26. Wetterberg L1, Aperia B, Gorelick DA, Gwirtzman HE, McGuire MT, Serafetinides EA, Yuwiler A. Age, alcoholism and depression are associated with low levels of urinary melatonin. J Psychiatry Neurosci. 1992 Nov;17(5):215-24.
27. Grant, W.B. Trends in diet and Alzheimer's disease during the nutrition transition in Japan and developing countries. J. Alzheimer's Dis. 2013, 38, 611–620.
28. Campbell AP1. DASH Eating Plan: An Eating Pattern for Diabetes Management. //Diabetes Spectr. 2017 May;30(2):76-81. doi: 10.2337/ds16-0084.
29. Wu L, Feng X, He A, Ding Y, Zhou X1, Xu Z. Prenatal exposure to the Great Chinese Famine and mid-age hypertension. //PLoS One. 2017 May 12;12(5):e0176413. doi: 10.1371/journal.pone.0176413. eCollection 20144.
30. Szyf M. Cooking Methods for Red Meats and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Study o. Biochim Biophys Acta. 2010 Oct-Dec;1799(10-12):750-9. Epub 2010 Sep 15.
31. Roseboom TJ, van der Meulen JHP, Osmond C, Barker DJP, Ravelli ACJ, Schroeder-Tanka JM, van Montfrans GA, Michels RPJ, Bleker OP. Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch Famine 1944–45.

32. Marventano S, Godos J, Platania A Galvano F, Mistretta A, Grosso G. Mediterranean diet adherence in the Mediterranean healthy eating, aging and lifestyle (MEAL) study cohort. *Int J Food Sci Nutr*. 2017 May 31:1-8. doi: 10.1080/09637486.2017.1332170. [Epub ahead of print]
33. Campbell AP. DASH Eating Plan: An Eating Pattern for Diabetes Management. *Diabetes Spectr*. 2017 May;30(2):76-81. doi: 10.2337/ds16-0084.
34. Qin B, Moorman PG, Kelemen LE, Alberg AJ, Barnholtz-Sloan JS, Bondy M, Cote ML, Funkhouser E, Peters ES, Schwartz AG, Terry P, Schildkraut JM, Bandera EV. Dietary Quality and Ovarian Cancer Risk in African-American Women. *Am J Epidemiol*. 2017 May 23:1-9. doi: 10.1093/aje/kwx022.
35. Bhatnagar A1. Environmental Determinants of Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2017 Jul 7;121(2):162-180. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.306458.
36. Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. [(accessed on 29 August 2013)]. //Int. J. Cancer. 2010 127 Available online: materials26. World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. Geneva, WHO, 2008.
37. Bushuev V.V., Golubev V. S., Korobeinikov A.A.Selyukov G. Human capital for the socio-humanitarian development. Moscow:IATSEnergiya, 2008.96p300copiesISBN978-5-98420-034-9.